



Mécanismes osmorégulateurs et adaptation évolutive des crevettes Palaemonidae aux milieux estuariens

Nesrine Boudour

► To cite this version:

Nesrine Boudour. Mécanismes osmorégulateurs et adaptation évolutive des crevettes Palaemonidae aux milieux estuariens. Zoologie des invertébrés. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014. Français. NNT : 2014MON20061 . tel-01361960

HAL Id: tel-01361960

<https://theses.hal.science/tel-01361960>

Submitted on 7 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université Montpellier 2**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**
Et de l'unité de recherche **UMR 5119 ECOSYM**

Spécialité : **Biologie des Organismes**

Présentée par **BOUDOUR Nesrine**

**MÉCANISMES OSMORÉGULATEURS ET
ADAPTATION ÉVOLUTIVE DES CREVETTES
PALAEMONIDAE AUX MILIEUX
ESTUARIENS**

Soutenue le 5 Décembre 2014 devant le jury composé de

Mme Anne-Sophie Martinez, Maître de Conférence, Université de Caen	Rapporteur
M. Jean-Yves Toullec, Maître de Conférence, Université Paris 6	Rapporteur
M. Patrick Berrebi, Directeur de Recherche CNRS, UM2	Président du jury
Mme Sylvie Tambutti, Directrice de Recherche, Centre Sc. de Monaco	Examineur
M. Gert Flik, Professeur, Université de Nijmegen, Pays-Bas	Examineur
Mme Viviane Boulo, Chercheur Ifremer, Nouvelle Calédonie	Directrice de thèse
Mme Catherine, Lorin-Nebel, Maître de Conférence, UM2	Codirectrice de thèse
M. Guy, Charmantier, Professeur Emérite, UM2	Codirecteur de thèse

Remerciements

Bien qu'une thèse soit le fruit d'un travail personnel, je n'aurais jamais abouti à de tels résultats sans le soutien et l'aide des personnes qui m'ont entourée durant ces 3 années. Ces années ont été pour moi une véritable aventure très enrichissante, que ce soit sur le plan professionnel ou humain. J'espère que les lignes qui suivent résument toute la gratitude que j'éprouve pour les personnes citées.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes trois encadrants qui furent très complémentaires ; *Viviane Boulo*, merci d'avoir partagé ton expérience en biologie moléculaire, la rigueur dans le travail est quelque chose que j'ai appris de toi. Merci pour les remarques avisées qui ont fait avancer ce travail. La distance ne t'a pas empêchée d'être présente, tous nos échanges et discussion m'ont été extrêmement bénéfiques. Merci pour la confiance que t'as su mettre en moi et tes encouragements qui m'ont aidée à aller de l'avant. *Catherine Lorin-Nebel*, merci pour toutes les propositions et pistes que tu m'as suggérées et pour nos discussions foisonnantes d'idées, j'ai vraiment appris énormément en travaillant avec toi, nos schémas d'ionocyte me manqueront. Ta présence, ton aide et ton soutien tout au long de la thèse et particulièrement durant les derniers jours de rédaction ont beaucoup compté pour moi, un chaleureux merci pour tout ça. *Guy Charmantier*, merci pour votre disponibilité, vos conseils et le temps que vous m'avez consacré pour la lecture de ce manuscrit, votre investissement personnel pour le travail est pour moi un véritable modèle. Merci d'avoir veillé au bon déroulement et à l'aboutissement de cette thèse. Je n'oublierai pas nos discussions matinales, vos pensées et votre soutien quand j'avais des problèmes de santé, tout ça m'a fait chaud au cœur.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers *Anne-Sophie Martinez*, Maître de conférences de l'Université de Caen, et *Jean-Yves Toullec*, Maître de conférences de l'Université Paris 6, pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit. J'exprime également ma reconnaissance envers *Sylvie Tambutti*, Directeur de Recherche au Centre Scientifique de Monaco, *Gert Flük*, Professeur à l'Université de Nijmegen au Pays bas et *Patrick Berrebi*, Directeur de Recherche CNRS à l'UM2, d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Patrick Berrebi, merci également pour votre disponibilité et les conseils que vous m'aviez prodigués lors de mes comités de thèse et que j'ai pris en compte en rédigeant ce manuscrit.

Un grand merci à *Mireille Charmantier-Daures*, les remarques pertinentes sur les résultats, ton expérience sur les crustacés ainsi que les conseils avisés en microscopie m'ont été d'une grande aide, merci pour le temps que nous avons passé ensemble à observer les coupes, capturer les images et discuter de l'ultrastructure des branchies de crevettes...

J'ai eu la chance d'effectuer ma thèse au sein de l'équipe *AE0*, qui est une équipe riche de sa diversité offrant un cadre idéal pour se réaliser pleinement. Je tiens donc à remercier :

Le directeur de l'équipe, *Jehan-Hervé Lignot*, pour m'avoir fait profiter de son expérience en immunogold.

Je remercie particulièrement *Evelyse Grousset* de m'avoir initié aux techniques d'histologie et d'avoir partagé son expérience et sa patience dans la confection des coupes. Tes conseils et ton aide m'ont été précieux. Je te témoigne ma sympathie.

Je remercie *Eva Blondeau-Bidet*, qui m'a apporté son aide lorsque les techniques de laboratoire m'étaient inconnues ; je te souhaite bonne continuation dans tes projets.

Patricia Cucchi et *Elliot Sucre*, je vous remercie pour votre gentillesse et pour tout ce que vous m'avez appris durant mon stage de Master.

Emilie Farcy, merci pour ta sympathie et ton humour que j'adore.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui sont passées par le labo; *Romina Ituarte* et *Dominique Pham*, merci pour les échanges que j'ai pu avoir avec vous sur mon sujet. *Ainaz Shirangi*, merci pour ton aide et ton soutien, bon courage pour la suite de ta thèse. *Maryline Bossus*, merci de m'avoir fait profiter de ton expérience. Je remercie également les stagiaires *Christine Beardsworth* et *Lucie Gerber* pour les échanges sympathiques qu'on a eus au bureau. Merci aussi aux stagiaires que j'ai pu encadrer plus ou moins longtemps, votre aide m'a été très précieuse, merci donc à *Margot Dalisson* et *Eddy Duppont*.

Merci au technicien de la station marine de Helgoland (*AWI*) *Uve Nettelman* pour avoir pris soin des crevettes. Merci également à *Klaus Anger* pour avoir fourni les échantillons chaque été mais aussi pour sa contribution scientifique dans ce travail.

Franck Godiaret, merci de nous avoir appris à manipuler le microscope électronique.

Je n'oublie pas d'adresser un remerciement particulier à tata *Assia* que j'affectionne beaucoup et qui m'a accueillie chaleureusement au sein de sa petite famille. Un grand merci.

Je remercie également *mes beaux-parents* pour leur soutien et leur sympathie, je n'oublierai jamais les gâteaux d'anniversaire que vous me faisiez même en étant loin de vous.

Je dédie cette thèse à *mes parents*, qui ont dû consentir quelques sacrifices pour me permettre d'arriver au terme de mes études. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à eux. Leur présence est le pilier fondateur de ce que je suis et ce que je fais. Ma plus profonde affection.

Enfin, bien plus que des remerciements pour *mon mari*, la personne qui était la plus proche à mon cœur durant ces années que j'ai passées en France, qui a su me soutenir, me supporter, m'aider... pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été faciles. Cette thèse et moi te devons beaucoup. Merci.

Sommaire

Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	5
1. Biodiversité des crustacés décapodes.....	7
2. Histoire évolutive et origine du genre <i>Macrobrachium</i>	7
3. Adaptations reproductrices aux environnements limniques.....	13
4. Adaptations physiologiques aux estuaires et aux milieux d'eau douce.....	15
5. Objectifs de la thèse.....	17
Chapitre I : Osmorégulation chez les crustacés.....	19
1. Différents types de régulation ionique chez les crustacés.....	21
2. Organes osmorégulateurs.....	23
3. Structure et organisation des branchies chez les crevettes palaemonidae.....	26
4. Régulation ionique au niveau cellulaire.....	27
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	29
1. Matériel Biologique.....	31
2. Elevage et maintenance des animaux.....	32
3. Expositions expérimentales à la salinité.....	33
4. Méthodes d'expérimentation.....	33
Chapitre III : Ontogenèse des organes osmorégulateurs chez <i>M. amazonicum</i> et <i>M. pantanalense</i>.....	35
1. Travaux antérieurs.....	37
2. Résultats personnels:	
Structure de la cavité branchiale et de la glande antennaire au cours de l'ontogenèse.....	39
Localisation de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase au niveau des organes osmorégulateurs en milieu de faible (5 ppt) et forte (25 ppt) salinité.....	40
3. Article 1: Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp <i>Macrobrachium amazonicum</i> : comparative ontogeny of osmoregulatory organs.....	43

Chapitre IV : Ultrastructure des organes de la cavité branchiale de *M. amazonicum* et distribution cellulaire de la Na^+/K^+ ATPase et de la V-type H^+ ATPase.....57

1. Travaux antérieurs.....59
2. Résultats personnels:
 - Ultrastructure de la cavité branchiale et effet de la salinité.....61
 - Localisation de la VHA et de la NKA au niveau de la cavité branchiale; influence de la salinité.....62
3. Article 2 : Differential distribution of V-type H^+ ATPase and Na^+/K^+ ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*.....65

Chapitre V : Mécanismes d'osmorégulation chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense* : expression des osmoeffecteurs (Na^+/K^+ ATPase, V-type H^+ ATPase et l'échangeur Na^+/H^+) au cours de l'ontogénèse.....79

1. Travaux antérieurs.....81
2. Résultats personnels:
 - Expression de la sous-unité alpha de la NKA *via* la quantification des transcrits.....83
 - Expression de la sous-unité B de la VHA *via* la quantification des transcrits.....84
 - Expression du NHE3 *via* la quantification des transcrits, et immunolocalisation.....85
3. Article 3 : Osmoregulation in two recently separated *Macrobrachium* species: ion transporter expression patterns during ontogeny.....89

Chapitre VI : Discussion et conclusion générale.....113

Liste des publications et communications personnelles.....129

Références bibliographiques.....133

Liste des abréviations

NKA	Na^+/K^+ ATPase
VHA	V-type H^+ ATPase
NHE	Na^+/H^+ exchanger
ED	Eau douce
Ma	Millions d'années
A	<i>M. amazonicum</i>
P	<i>M. pantanalense</i>

INTRODUCTION

*"Nothing in Biology Makes Sense
Except in the Light of Evolution"*
(Dobzhansky, 1973)

Introduction

1. Biodiversité des crustacés décapodes

La diversité des crustacés décapodes a été estimée à près de 15000 espèces existantes et 3000 espèces fossiles (De Grave et al., 2009). Les crevettes caridae comprennent environ 3300 espèces, la deuxième plus grande diversité au sein de l'ordre des décapodes, après les crabes brachyours (environ 6800 espèces; Ng et al., 2008). Les crevettes palaemonidae (Rafinesque, 1815) constituent la plus grande famille de crevettes, avec près de 900 espèces, soit plus de 25 % du nombre total connu de l'infra-ordre des caridea. Les palaemonidae sont issues d'un clade ancestral marin tropical, qui a montré une tendance évolutive remarquable à s'adapter aux conditions non-marines, envahissant avec succès les milieux estuariens et limniques (Jalihal et al., 1993; Freire et al., 2003; Bauer, 2004; Augusto et al., 2009). Du fait des radiations adaptatives (Schluter, 2000; Glor, 2010), près de 300 espèces de palaemonidae vivent dans des habitats d'eau saumâtre ou d'eau douce (De Grave et al., 2008). La famille des Atyidae a colonisé l'eau douce avec succès, avec environ 40 genres et 400 espèces, dont 90 % sont limniques.

Parmi les 116 genres actuellement connus de la famille des palaemonidae, les crevettes du genre *Macrobrachium* (Bate, 1868) ont colonisé avec succès les estuaires et les habitats d'eau douce. Avec plus de 240 espèces, elles ont une distribution géographique à l'échelle mondiale, dans les régions tropicales et subtropicales. Ces espèces vivent en majorité dans le Sud, le Sud-Est, et l'Asie de l'Est, ainsi qu'en Australie (Jayachandran, 2001; Murphy et Austin, 2005; De Grave et al., 2008; Chen et al., 2009). D'autres groupes de *Macrobrachium* se trouvent le long des côtes ouest de l'Afrique (Holthuis, 1951) et en Amérique (Holthuis, 1952; Pereira, 1997; Magalhães et Pereira, 2007). Parmi les espèces néotropicales (Amérique), aucune n'est partagée avec d'autres régions biogéographiques; elles sont géographiquement isolées de toutes les congénères palaeotropicales (Indo-Ouest-Pacifique et Afrique de l'Ouest).

2. Histoire évolutive et origine du genre *Macrobrachium*

Les archives fossiles actuellement disponibles sur les crevettes du genre *Macrobrachium* ne sont pas riches en informations sur le temps et la région géographique de leur origine. Leur distribution mondiale actuelle montre trois centres d'occurrence distincts, avec une

composition spécifique complètement différente dans l'Indo-Ouest-Pacifique, l'Afrique de l'Ouest et en Amérique (Anger, 2013) (Fig. 1). Ceci suggère que le genre *Macrobrachium* existait avant la dislocation de la Gondwana et la formation de l'Océan Atlantique.

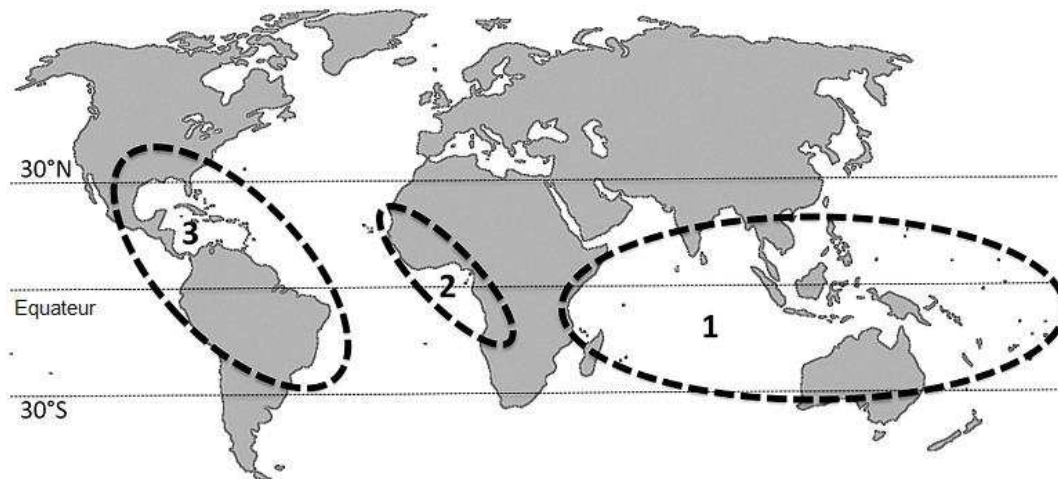


Fig. 1 : Distribution biogéographique de *Macrobrachium* spp. dans les régions tropicales. 1, Indo-Ouest-Pacifique ; 2, Afrique de l'Ouest ; 3, Amériques (Anger, 2013).

Ouverture de l'Océan Atlantique et séparation des lignées paleotropicales et néotropicales: L'Océan Atlantique a commencé à s'ouvrir pendant le Mésozoïque, et la dernière connexion terrestre entre l'Afrique de l'Ouest et le Nord de l'Amérique du Sud date du Crétacé (112 Ma) (Tableau 1) (Torsvik et al., 2009). Le fond de l'Océan Atlantique a continué à s'élargir jusqu'à la fin du Crétacé et du Paléogène, pour atteindre ses dimensions actuelles à l'Oligocène ou au Miocène inférieur (23 Ma). Ceci implique que la connectivité entre les populations de *Macrobrachium* de l'Afrique de l'Ouest et de l'Amérique du Sud *via* le transport planctonique des larves a dû déjà diminuer avant la fin du Mésozoïque (Anger, 2013). Le flux de gènes aurait été complètement interrompu avant la limite Crétacé-Cénozoïque (65 Ma), quand l'Océan Atlantique est devenu une barrière vicariante efficace qui a entraîné un isolement reproductif entre les clades palaeotropicaux (Afrique et Asie) et néotropicaux (Amérique) de *Macrobrachium*. Ceci a été suivi par des radiations régionales indépendantes à l'origine d'une grande diversité endémique en Amérique Centrale (Feldmann et Schweitzer, 2006).

Formation de l'isthme de Panama et séparation des lignées Atlantiques et Pacifiques: La séparation géologique entre les océans Atlantique et Pacifique est généralement considérée comme un important événement vicariant qui a entraîné une diversification régionale dans de nombreux groupes d'organismes aquatiques et terrestres (Lessios, 2008). À la suite d'une collision et subduction de la plaque Cocos sous la plaque Caraïbes moins dense depuis le Miocène supérieur, l'isthme de Panama est apparu progressivement, s'achevant seulement pendant le Pliocène, à 3,7-2,8 Ma (Ibaraki, 1997; Kirby et al., 2008; Lessios, 2008). Les espèces actuelles de *Macrobrachium* habitant les rivières se déversant dans le Pacifique Est ou l'Atlantique Ouest montrent une diversité similaire mais une composition spécifique complètement différente de chaque côté de l'isthme de l'Amérique Centrale. Ce modèle biogéographique indique un rôle crucial du pont terrestre panaméen pour la diversification des lignées de crevettes côtières (Anger, 2013).

Les incursions marines, l'orogénèse des Andes et la formation des lignées limniques: Les incursions marines constituent un des événements importants qui ont façonné la biodiversité de l'Amazonie. Le dernier événement de grande incursion marine, avant l'établissement définitif de l'Amazonie, est daté entre 15 et 10 Ma avec une élévation du niveau de la mer de 150 m. Par conséquent un vaste système de zone humide appelée « Pebas » s'est formé au cours du Miocène.

Outre les incursions marines, la formation du système Pebas (Fig. 2) a été favorisée aussi par les changements climatiques associés à l'orogénèse des Andes. Le climat moderne de la Mousson est probablement apparu avant le Miocène inférieur, quand le massif des Andes a atteint une hauteur critique d'environ 2000 m (Wesselingh et Hoorn, 2011). La montée de courants aériens humides provenant de l'Est a favorisé l'augmentation de la condensation et les précipitations le long du flanc oriental des Andes, ce qui a amélioré l'approvisionnement en eau douce des plaines subandines (Hoorn et al., 2010). Des preuves de la présence d'eau douce ont été enregistrées dans la partie supérieure de l'Amazonie il y a environ 11 Ma.

A la suite de ces grands événements paléo-environnementaux (incursions marines et orogénèse des Andes), les organismes marins ont envahi les eaux intérieures limniques. Au cours des régressions ultérieures, les immigrants sont devenus isolés de leur environnement ancestral, la mer, et ont finalement été « piégés » dans leur nouvel habitat. Alors que la plupart des taxons marins ont sans doute disparu, certaines lignées se sont adaptées, au moins partiellement, avec succès aux conditions limniques. Le système Pebas du Miocène peut donc

être considéré comme une « pompe à lignées » qui a « injecté » des taxons marins dans des environnements limniques (Lovejoy et al., 2006).

Compte tenu des conditions prévalant dans le système Pebas, avec une eau partiellement saumâtre et chaude, il est plausible que les espèces estuariennes des Caraïbes, y compris les crevettes palaemonidae, y aient trouvé des conditions de vie favorables. En raison de l'extension de ce système de zone humide tropicale sur de grandes distances et probablement avec de grandes variations régionales dans la connectivité hydrologique, la salinité, la végétation, la productivité, et d'autres variables paléo-écologiques, les crevettes du genre *Macrobrachium* ont probablement prospéré et elles se sont dispersées avec succès au cours des 13 Ma de l'existence de ce vaste environnement du Miocène (environ 23-10 Ma, Hoorn et al., 2010). Au nord de la zone, où la salinité était la plus élevée du système Pebas, *Macrobrachium* sp. est restée incomplètement adaptée à l'eau douce. Le maintien d'espèces dont les adultes étaient limniques dépendait d'une stratégie d'exportation avec des migrations reproductrices et un développement larvaire en eau saumâtre. Dans ces lignées, les traits d'histoires de vie auraient été similaires à ceux des espèces côtières actuelles de *Macrobrachium*.



Fig. 2 : Les incursions marines et l'extension du système Pebas au nord de l'Amérique du Sud durant le Miocène (23-11 Ma) (Anger, 2013).

Formation et fragmentation du bassin de l'Amazone: Durant cette période, la direction des cours d'eau dans la vallée de la Magdalena a été inversée vers l'ouest par rapport à un soulèvement de la Cordillère des Andes au Nord-Ouest. Cette nouvelle amplitude était assez élevée pour isoler le bassin de la Magdalena. Les régressions marines et la dynamique du massif des Andes entre 8 à 10 Ma ont été associées à la mise en place finale du bassin de l'Amazone. Le Paraná-Paraguay a été séparé de la Proto-Amazone il y a 10 Ma. Le bassin de l'Orénoque s'est formé avec l'apparition de l'arc des Vaupes entre 8 et 5 Ma. La percée finale du fleuve de l'Amazone vers son cours actuel s'est produite avec le soulèvement final de la Cordillère centrale des Andes, liée à l'élévation de l'arc Purus. Parallèlement, le soulèvement final des Andes au Nord-Ouest a entraîné l'établissement du lac de Maracaibo. Les évidences des fluctuations du niveau de la mer donnent une estimation d'une élévation de 100 m il y a 5 Ma sur une durée d'environ 800 000 ans. La partie supérieure de l'Amazone a été isolée de l'Orénoque et des rivières Paraná situées respectivement dans les boucliers Brésilien et Guyanais. Après les régressions marines, et pendant les dernières 4 Ma, la dynamique des Andes a conduit à la fragmentation de la partie supérieure de l'Amazone en plusieurs arcs et à la séparation du bassin du Paraguay qui s'est développé plus tard et a donné le Pantanal actuel (Carvalho et Albert, 2011). C'est dans ce contexte que se sont déroulées l'évolution et les spéciations du genre *Macrobrachium* en Amérique du Sud.

***Macrobrachium amazonicum* et *Macrobrachium pantanalense*:** *Macrobrachium amazonicum* est une espèce largement distribuée en Amérique du Sud (Fig. 3). Elle vit dans les fleuves se déversant sur les côtes nord et nord-est d'Amérique du Sud (Magalhães et Pereira, 2007; Maciel et Valenti, 2009) ; elle se trouve également à l'intérieur des terres dans les eaux du bassin de l'Orénoque et de l'Amazone, jusqu'à environ 3400 km de la côte Atlantique (Odinetz-Collart et Rabelo, 1996; García-Dávila et Magalhães, 2004). D'autres populations vivent dans les cours supérieurs des fleuves du Paraguay et du Paraná et dans les eaux intérieures adjacentes des plaines du Pantanal, qui appartiennent au système de drainage de La Plata (Bialecki et al., 1997; Magalhães, 2000 b; Magalhães et al., 2005; Pantaleão et al., 2012). Ce bassin versant a été hydrologiquement séparé du bassin de l'Amazone et de l'Orénoque probablement depuis le Miocène (10 Ma ; Hubert et Renno, 2006) ou au moins depuis le Pliocène (4 Ma ; Espurt et al., 2007). Dans les populations continentales, par exemple dans celles qui vivent dans le Pantanal (Fig. 3) proche du centre géographique de l'Amérique du Sud, la migration des femelles ou l'exportation larvaire vers les estuaires qui se trouvent à des milliers de kilomètres n'ont jamais été observées et sont considérées comme

biologiquement impossibles (Anger, 2013). Ceci implique que ces populations effectuent tout leur cycle de vie en eau douce, ce qui soulève la question de savoir si les populations estuariennes et les populations hololimnétiques attribuées à *M. amazonicum* peuvent vraiment appartenir à la même espèce. Bien que les données moléculaires disponibles n'aient pas révélé une diversification génétique statistiquement significative au niveau de l'espèce (Vergamini et al., 2011; Robe et al., 2012), d'autres études comparatives récentes sur la reproduction, le développement, et les traits physiologiques ont révélé des différences biologiquement significatives entre les populations vivant dans le Pantanal et dans l'estuaire de l'Amazone (Anger et Hayd, 2010; Charmantier et Anger, 2011; Urzúa et Anger, 2011). Les populations de l'Amazone présentent un dimorphisme sexuel marqué avec des compétitions mâle-mâle importante. Ce n'est pas le cas chez les populations hololimnétiques du Pantanal, où il n'y a pas de dimorphisme sexuel visible (Anger, 2013). En outre, les mâles de la population du Pantanal n'expriment pas de morphotypes différents des femelles comme les populations de l'estuaire de l'Amazone, et ils atteignent une taille corporelle maximale inférieure à celle des femelles (Anger, 2013). Ces différences indiquent qu'une longue séparation vicariante a permis une diversification dans les différents bassins versants, ce qui implique que *M. amazonicum* est en fait un complexe d'espèces apparentées mais distinctes. Bien que les populations proches de l'estuaire soient biologiquement similaires à d'autres espèces côtières de *Macrobrachium* comme *M. acanthurus*, *M. olfersi*, *M. carcinus*, ou *M. heterochirus* (Anger et Moreira, 1998; Anger et al., 2002), les populations hololimnétiques, du moins celles du Pantanal, ont récemment (durant le cours même de cette thèse) été considérées comme appartenant à une espèce distincte dénommée *M. pantanalense* (dos Santos et al., 2013). Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons donc de deux espèces au lieu de deux populations.

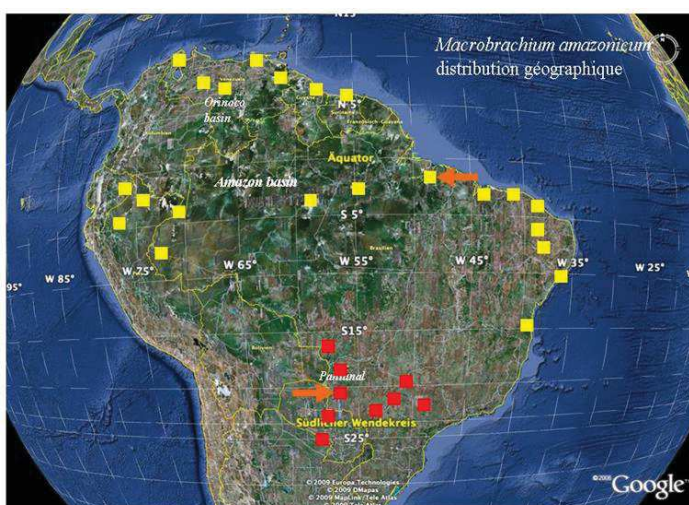


Fig. 3: Distribution géographique de *M. amazonicum* (A) (en jaune) et *M. pantanalense* (P) (en rouge).

Tableau 1 : Synthèse des événements majeurs au cours des temps géologiques qui ont conduit à la séparation de *M. pantanalense* et *M. amazonicum*. Nombres en millions d'années.

Éon	Ère	Période	Époque	Événements majeurs
P H A N É R O Z O Ï Q U E	M É S O Z O Ï Q U E Secondaire	Crétacé	Supérieur 100-72	Ouverture de l'Océan Atlantique et séparation des lignées paléotropicales et néotropicales du genre <i>Macrobrachium</i>
	C É N O Z O Ï Q U E Tertiaire	Néogène	Miocène 23-7,2	Elévation du niveau de la mer de 150 m. Formation du climat de la mousson grâce à l'orogénèse Andine en Amérique du Sud. Formation du système de zone humide « Pebas ». Invasion des organismes marins des eaux intérieures limniques. Adaptation des espèces marines aux environnements limniques suite aux régressions marines. Formation de l'Amazone.
			Pliocène 5,3-3,6	Elévation du niveau de la mer de 100 m. Formation de l'Orénoque. Régressions marines. Fragmentation de la partie supérieure de l'Amazone et séparation du bassin du Pantanal. Formation de l'isthme de Panama et séparation des lignées Atlantiques et Pacifiques du genre <i>Macrobrachium</i> .
		Quaternaire	Pléistocène et Holocène 2,5-0	Emergence de nouvelles espèces : <i>M. amazonicum</i> et <i>M. pantanalense</i>

3. Adaptations reproductrices aux environnements limniques

Parmi les adaptations répertoriées, la production de gros œufs et un raccourcissement de la phase larvaire planctonique, qui sont des caractères fréquemment associés à des invasions

limniques. Ces adaptations résultent probablement d'un changement évolutif progressif (Jalihal et al., 1993). Cette hypothèse a été confirmée par des études sur la variation de la taille des œufs et les caractéristiques des larves d'une espèce japonaise de *Macrobrachium*, *M. nipponense*, où des œufs significativement plus gros sont produits par des populations limniques par rapport aux populations estuariennes (Mashiko, 1999). Ce mode de développement abrégé a également été observé chez d'autres crevettes caridae mais aussi chez les crabes d'eau douce (Dobkin, 1969; Rabalais et Gore, 1985; Anger et al., 2007). Ceci suggère une évolution convergente généralisée du mode de développement abrégé chez les crustacés décapodes, mais aussi chez d'autres invertébrés aquatiques (Lee et Bell, 1999).

Cependant, certaines espèces ont des modes de développement larvaire long dans des eaux intérieures entièrement limniques, ce qui représente des exceptions frappantes à l'hypothèse de Jalihal et al., (1993). C'est le cas chez quelques espèces palaeotropicales de *Macrobrachium spp.* comme *M. lanceifrons* aux Philippines (Rasalan et al., 1969), *M. niloticum* du lac Tchad dans le centre nord-ouest d'Afrique (Williamson, 1972) et *M. walvanensis* du nord-ouest de l'Inde (Almelkar et al., 2000).

Les espèces néotropicales de *Macrobrachium* n'échappent pas à cette exception. Pour les espèces qui nous intéressent ici, *M. amazonicum* présente un mode de développement long avec 6 à 7 stades larvaires zoé et 3 à 5 (généralement 4) stades décapodites, avant l'achèvement de la métamorphose et le passage au stade juvénile (Charmantier et Anger, 2011). *M. pantanalense*, bien qu'elle soit entièrement adaptée à l'eau douce, présente un développement larvaire encore plus long, comprenant au moins 12 (pour la plupart environ 15) stades zoé et un nombre variable de stades décapodites (Anger et Hayd, 2010; Schubert, 2010). Ces cas de développement long chez des espèces limniques ont été interprétés comme des signes de transitions évolutives récentes des habitats marins côtiers aux habitats d'eau douce (Anger, 2013). Cette hypothèse implique que les transitions récentes doivent être associées à des modes partiellement abrégés, et seuls les très anciens clades limniques devraient montrer un développement fortement abrégé. Dans les deux familles de crevettes palaemonidae et atyidae, la plupart des espèces passent soit par un mode abrégé avec moins de 3 stades larvaires (Benzie et De Silva, 1983; Magalhães et Medeiros, 1998; Magalhães, 2000 a; Shy et al., 2001), ou par l'intermédiaire d'une configuration longue avec généralement plus de 8 stades larvaires (Hunte, 1980; Benzie, 1982; Willführ-Nast et al., 1993).

4. Adaptations physiologiques aux estuaires et aux milieux d'eau douce

Les adultes de l'espèce *M. amazonicum* vivent en eau douce à quelques dizaines/centaines de kilomètres de l'estuaire de l'Amazone. Les femelles ovigères effectuent une migration catadrome car le développement larvaire nécessite une eau salée. Les juvéniles regagnent ensuite l'habitat limnique des adultes. Pendant ces migrations, les crevettes sont donc exposées à des variations de salinité. Ce défi osmotique a sélectionné des adaptations physiologiques, dont l'osmorégulation (Freire et al., 2003; Augusto et al., 2009; Charmantier et al., 2009). La salinité exerce une pression sélective sur les adultes, mais aussi sur tous les stades du cycle de vie, y compris les embryons et les larves (Charmantier, 1998; Charmantier et Charmantier-Daures, 2001). Cependant, chez la plupart des crevettes diadromes, la fonction osmorégulatrice permettant la vie en eau douce est absente ou faiblement exprimée pendant les stades larvaires, de sorte que ceux-ci sont incapables de survivre et se développer dans des habitats limniques où les adultes vivent de façon permanente (Huong et al., 2004; Augusto et al., 2007; Rome et al., 2009; Charmantier et Anger, 2011). Chez ces espèces, la transition évolutive dans les habitats d'eau douce doit donc être considérée comme incomplète.

Des études comparatives sur les capacités osmorégulatrices de *M. amazonicum* et *M. pantanalense* ont révélé l'existence de différences dans la tolérance à la salinité et la régulation osmotique et ionique entre les deux espèces (Charmantier et Anger, 2011). Tous les stades ontogénétiques de *M. amazonicum* survivent dans l'eau saumâtre et l'eau de mer (Fig. 4). Ils sont hyper-osmorégulateurs c'est-à-dire qu'ils maintiennent la pression osmotique de leur hémolymphe supérieure à celle du milieu externe à des salinités < 17 ppt (le point iso-osmotique), et hypo-osmorégulateurs en maintenant leur pression osmotique inférieure à celle du milieu externe à des salinités plus élevées. Cependant, l'hyper-osmorégulation en eau douce (entre 0,1 et 1 ppt) est absente chez les larves à l'exception du premier stade post-embryonnaire (zoé I) ; cette capacité réapparaît plus tard dans le développement chez les juvéniles et les adultes, donc après la métamorphose. Ce modèle d'osmorégulation et de tolérance à une large gamme de salinités est compatible avec leur cycle de vie diadrome (Magalhaes, 1985 ; Magalhaes et Walker, 1988 ; Ordinetz-Collart, 1991 ; Augusto et al., 2007). Les adultes vivent en milieu d'eau douce ou rarement saumâtre. Lors de la reproduction, les femelles migrent vers l'estuaire où a lieu l'éclosion des larves et leur développement. Après la métamorphose, les juvéniles font la migration inverse et retournent en eau douce (Guest, 1979 ; Charmantier et Anger, 2010).

En revanche, *M. pantanalense* effectue l'intégralité de son cycle de vie en eau douce (Anger et Hayd, 2010). Tous les stades ontogénétiques survivent en eau douce et sont hyper-

osmorégulateurs pour des salinités < 17 ppt (Fig. 4). Pour des salinités > 25 ppt, la survie diminue et aucun stade ne survit en eau de mer. Entre 17 ppt et 25 ppt tous les stades sont osmoconformes. Les mécanismes de régulation permettant une hypo-osmorégulation ne sont pas en place, et donc la pression osmotique de l'hémolymph suit celle du milieu externe. La perte totale de la capacité d'hypo-osmorégulation à des salinités élevées caractérisant *M. pantanalense* représente une des différences majeures avec *M. amazonicum* (Charmantier et Anger, 2010) (Fig. 4). Ces différences reflètent des styles de vie, une physiologie et des stratégies différentes de reproduction.

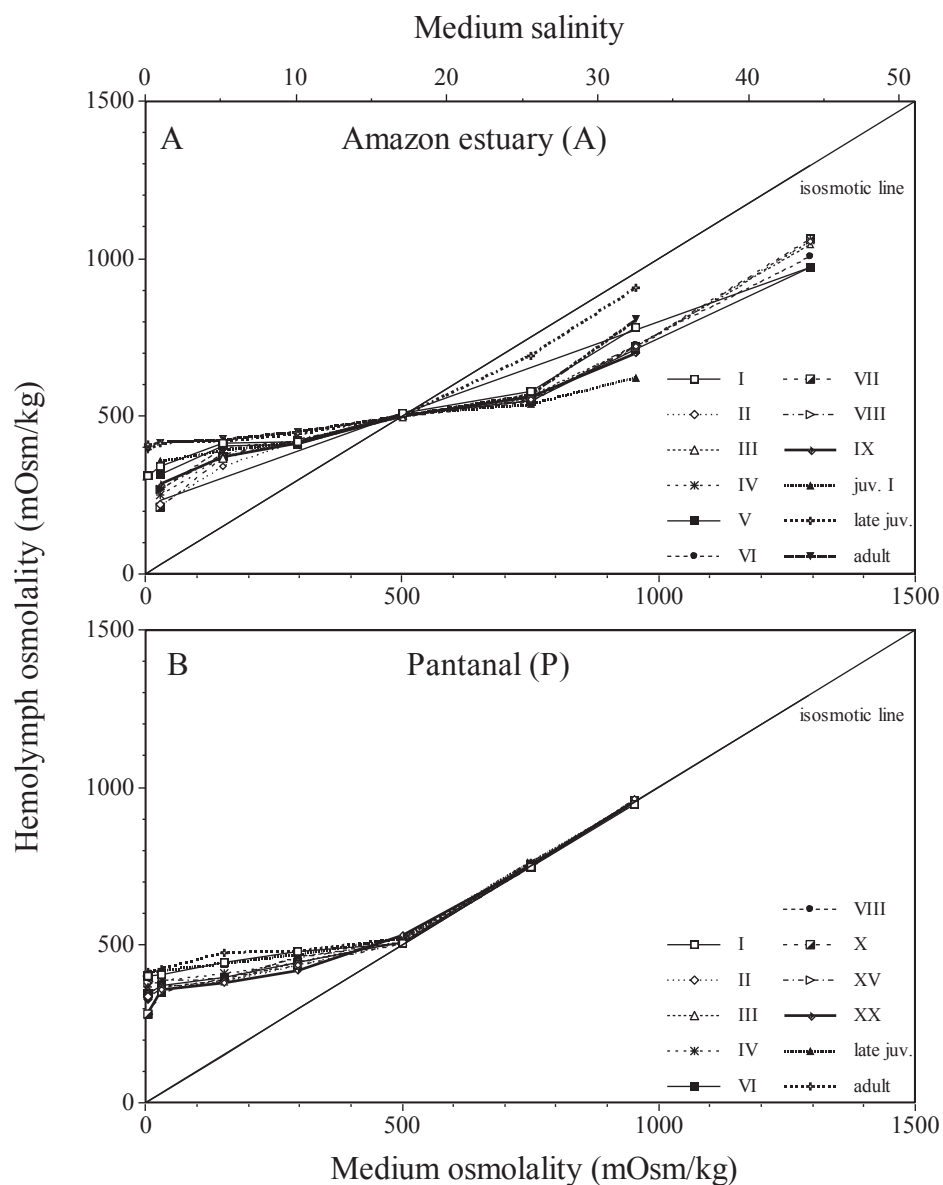


Fig. 4 : Variations de l'osmolalité de l'hémolymph en fonction de l'osmolalité/salinité du milieu extérieur, à différents stades ontogénétiques de *M. amazonicum* (A) et *M. pantanalense* (P). A : zoés : I-VI, décapodites : VII-IX ; P : zoés : I-XV, décapodites : XX (Charmantier et Anger, 2011).

Chez les espèces de *Macrobrachium* qui ont une stratégie d'exportation larvaire (fleuve-estuaire), la dépendance des larves à l'eau salée indique une adaptation évolutive incomplète à l'eau douce, ce qui reflète l'origine évolutive de ce clade avec des ancêtres marins côtiers. En revanche, chez les espèces hololimnétiques (stratégie de rétention larvaire), les larves ont acquis la capacité de se développer en eau douce. Cependant, comme un compromis, ces espèces ont perdu la fonction physiologique de l'hypo-osmorégulation, et donc, la capacité de vivre et de se développer en eau de mer. Des changements similaires dans les modèles de tolérance à la salinité ont également été observés chez les poissons et les mollusques d'eau douce, indiquant un niveau avancé d'adaptation aux conditions limniques (Lee et Bell, 1999).

5. Objectifs de la thèse

L'étude de l'osmorégulation et d'autres fonctions physiologiques chez des animaux adultes est importante pour la compréhension des modes de distribution écologiques. Cependant, chaque stade de l'histoire de vie est soumis à des pressions de sélection qui peuvent varier au cours de l'ontogénèse. Cela implique que les changements de la fonction osmorégulatrice doivent être étudiés au cours de l'ontogénèse pour une meilleure compréhension de l'adaptation d'une espèce à son habitat (Charmantier, 1998).

L'objectif de cette thèse est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes physiologiques tels que l'osmorégulation permettant l'adaptation évolutive à l'eau douce. Notre étude comparera deux espèces (récemment décrites en tant que telles), l'une ancestrale *M. amazonicum* (A), qui effectue des migrations reproductrices vers l'estuaire, et l'autre, *M. pantanalense* (P), qui a acquis au cours de son évolution la capacité d'effectuer tout son cycle en eau douce en gagnant la capacité de tous les stades post-embryonnaires à y hyper-osmoréguler et en perdant sa capacité à hypo-osmoréguler en eau salée. Le but de cette comparaison est de comprendre les différences physiologiques et moléculaires liées à l'osmorégulation entre les deux espèces au cours de l'ontogénèse, et de les relier à l'évolution de *M. pantanalense* vers l'eau douce. Pour cela nous avons étudié :

- ✓ L'ontogénèse comparative des organes osmorégulateurs, en particulier de la cavité branchiale,
- ✓ L'effet de la salinité sur l'ultrastructure des branchies et des branchiostégites,
- ✓ Les transporteurs ioniques impliqués dans l'osmorégulation au niveau des branchies et des branchiostégites (localisation cellulaire, expression de gènes).

A la suite de cette introduction générale, la thèse s'articule autour de six chapitres :

Le chapitre I de ce manuscrit rappelle les principaux mécanismes d'osmorégulation chez les crustacés sur le plan tissulaire, cellulaire et moléculaire.

Le chapitre II présente les modèles biologiques, *M. amazonicum* et *M. pantanalense*, et résume les différentes techniques utilisées.

Le chapitre III concerne l'étude de l'ontogenèse comparative des organes osmorégulateurs, notamment la cavité branchiale et la glande antennaire, entre les deux espèces de *Macrobrachium*.

Le chapitre IV décrit l'ultrastructure des branchies et des branchiostégites. Ce chapitre porte également sur l'étude de la pompe sodium/potassium Na^+/K^+ ATPase (NKA) et de la pompe à proton V-type H^+ ATPase (VHA). Leur localisation cellulaire précise au niveau de l'épithélium des branchies et des branchiostégites est étudiée et l'implication de la VHA dans l'osmorégulation en eau douce est particulièrement discutée.

Le chapitre V présente les variations de l'expression des transporteurs ioniques (NKA, VHA et l'échangeur Na^+/H^+ « NHE3 ») impliqués dans l'osmorégulation au cours de l'ontogénèse. La localisation cellulaire du NHE3 au niveau des branchies est également traitée dans ce chapitre ainsi que l'élaboration d'un modèle cellulaire fonctionnel pour l'absorption ionique en eau douce chez *Macrobrachium spp.*

Le chapitre VI résume l'ensemble des résultats de cette thèse, et présente une conclusion générale et les perspectives de recherche.

Enfin, une liste des références bibliographiques citées dans le corps du texte est regroupée à la fin du manuscrit en plus d'une liste des productions scientifiques personnelles.

Cette thèse est organisée autour de trois publications dont deux parues. Les deux premières ont été rédigées avant la séparation des deux populations (Amazon A, Pantanal P) en deux espèces (*M. amazonicum*, *M. pantanalense*). Les lettres A et P se rapportant dans ces textes aux deux populations font dorénavant référence aux deux espèces.

CHAPITRE I.

Osmorégulation chez les crustacés

Chapitre I : Osmorégulation chez les crustacés

La salinité est un paramètre important dans le recrutement, la répartition ou la reproduction des animaux aquatiques (Anger, 2003). Les crustacés décapodes sont présents surtout dans le milieu océanique, mais aussi dans les milieux saumâtres, d'eau douce et même parfois terrestres. Certaines espèces vivent dans un environnement de salinité stable, d'autres peuvent changer de milieu au cours de leur vie, ou migrer de manière épisodique à la recherche de meilleures conditions de nourriture, de température ou d'abris, ce qui peut les exposer à des salinités plus ou moins variables.

Quel que soit son environnement osmotique, l'animal est le siège de processus physiologiques permettant de maintenir l'équilibre hydrominéral entre son milieu intérieur et le milieu environnant dans des limites compatibles avec sa survie: ces processus recouvrent les mécanismes de régulation hydrominérale ou osmorégulation. Ces mécanismes permettent l'excrétion ou l'absorption ionique, en particulier de Na^+ et Cl^- ainsi que l'absorption ou le rejet d'eau (Mantel et Farmer, 1983 ; Péqueux, 1995 ; Charmantier et al., 2009). Sur le plan physiologique, en milieu de faible salinité et notamment en eau douce, l'animal en situation d'hyper-osmorégulation est confronté à une entrée massive d'eau par osmose et à une perte d'ions par diffusion. En milieu concentré, en général pour des salinités proches ou supérieures à celle de l'eau de mer, l'animal qui hypo-osmorégule doit faire face à une déshydratation et à une invasion d'ions. Le maintien de l'équilibre hydrominéral est essentiellement assuré par des mécanismes de transports ioniques actifs, entre le milieu extérieur et l'hémolymphe, au niveau des organes osmorégulateurs mais aussi potentiellement au niveau du tégument en limitant sa perméabilité (Mantel et Farmer, 1983 ; Péqueux, 1995 ; McNamara et Lima, 1997 ; Charmantier et al., 2009).

1. Différents types de régulation ionique chez les crustacés

Les crustacés représentent un bon modèle pour l'étude de l'écophysiologie, du fait de la grande variété de leurs habitats et de leurs modes de régulation osmotique. Tous les types d'osmorégulation sont représentés dans ce groupe (Fig. 5) (Charmantier et al., 2009). En comparaison, les poissons téléostéens présentent un modèle unique d'osmorégulation (Evans, 2008).

Les crevettes palaemonidae sont généralement euryhalines avec une capacité à hyper- ou hypo-osmoréguler en fonction de la salinité du milieu (Castille et Lawrence, 1981; Mantel et

Farmer, 1983; Chen et Lin, 1994; Huong et al., 2010). Chez *M. amazonicum*, il a été montré que tous les stades ontogénétiques hyper-régulent en milieu dessalé et hypo-régulent en eau de mer, et que leur point iso-osmotique se situe à 17 ppt (Charmantier et Anger, 2011).

L'aptitude à osmoréguler à une certaine salinité varie en fonction de plusieurs facteurs: l'espèce, le stade de mue, la température, la présence de contaminants, des facteurs de stress ou encore le stade de développement de l'animal (Lignot et al., 2000; Lemaire et al., 2002; Buckle et al., 2006). A partir de cette caractéristique, quatre modèles d'osmorégulation ont été définis chez les crustacés (Fig. 5) (Charmantier et Charmantier-Daures, 2001):

-La régulation iso-osmotique ou osmoconformité : la pression osmotique de l'hémolymph suit la variation de la salinité du milieu externe. Ce mode concerne les espèces osmoconformes, généralement sténohalines, qui vivent dans un milieu stable telle la pleine mer, ou à faibles variations de salinité comme les eaux sub-côtières. On peut citer dans ce cas les crabes *Libinia emarginata* (Mantel et Farmer, 1983), *Chionoecetes sp.* (Hardy et al., 1994), *Cancer pagurus* (Péqueux, 1995) et la petite cigale de mer *Scyllarus arctus* (Vilotte et al., 1980).

-La régulation hyper-iso-osmotique : la régulation est hyper-osmotique en milieu dilué et quasiment iso-osmotique en eau de mer et en milieu concentré. Les crustacés appartenant à ce groupe se rencontrent le plus souvent près des côtes ou dans les estuaires. On retrouve dans ce groupe les crabes *Carcinus maenas* et *Hemigrapsus nudus* (Jones, 1941; Corotto et Holliday, 1996), et les homards *Homarus americanus* (Charmantier et al., 1984 et 1991) et *Homarus gammarus* (Charmantier et al., 1984).

-la régulation hyper-hypo-osmotique : la régulation est hyper-osmotique en milieu dilué et hypo-osmotique en milieu concentré. Les espèces possédant ce mode de régulation sont considérées comme fortement régulatrices. On les rencontre sur les côtes, les estuaires, les lagunes ou les étangs côtiers, où la salinité est potentiellement variable. Appartiennent à ce groupe les crabes *Uca crenulata* (Jones, 1941), *Pachygrapsus crassipes* (Prosser et al., 1955; Gross, 1957) et *Pachygrapsus marmoratus* (Pierrot, 1994). Les crevettes pénéides qui effectuent plutôt des migrations entre les milieux de salinités différentes, et de nombreuses crevettes caridae présentent également ce mode d'osmorégulation (Charmantier-Daures et al., 1988).

-la régulation hyper-osmoconforme : la régulation est légèrement hyper-osmotique en milieu dilué et concentré. Ce mode de régulation est généralement trouvé chez les crustacés d'eau

douce comme l'amphipode *Gammarus oceanicus* (Brodie et Halcrow, 1978) et certaines larves de décapodes (Charmantier, 1980).

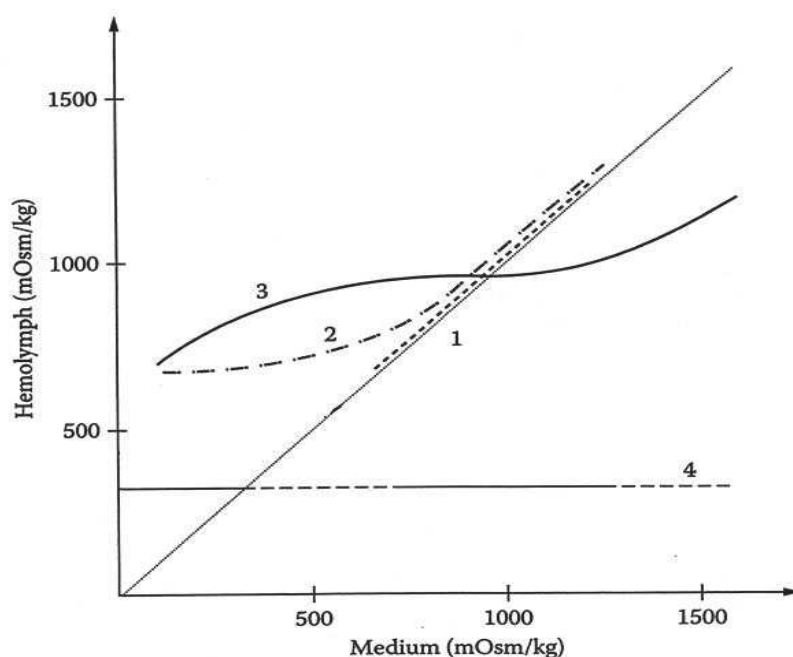


Fig. 5 : Régulation osmotique chez divers groupes d'animaux aquatiques. 1 : iso-osmotique, 2 : hyper-isosmotique, 3 : hyper-hypo-osmotique, 4 : régulation chez les poissons téléostéens (Charmantier et al., 2009).

2. Organes osmorégulateurs

Les échanges ioniques se produisent au niveau des structures qui sont en contact direct ou indirect avec le milieu extérieur, comme la paroi du corps (le tégument), l'intestin, les organes excréteurs, et les cavités branchiales. Différents aspects de leur fonctionnement et de leur implication dans l'osmorégulation chez les crustacés ont été régulièrement abordés dans la littérature (Gilles et Péqueux, 1983 ; Mantel et Farmer, 1988 ; Lucu, 1990 ; Péqueux, 1995 ; Charmantier et al., 2009).

Le tégument

La surface générale du corps par opposition à la surface des structures spécialisées telles que les branchies, pourrait être considérée comme un site important d'échange de matière entre les fluides extracellulaires et le milieu environnant. Des gains ou pertes de matériel devraient se produire à ce niveau d'après les lois de la diffusion/osmose des solutés et de l'eau. Cependant,

les mouvements d'ions à travers la paroi du corps sont considérés comme négligeables depuis les premiers travaux de Krogh (1938) du fait de la présence d'une carapace calcifiée épaisse et peu perméable. Néanmoins, des études suggèrent que la carapace isolée de crabes peut présenter un certain degré de perméabilité à l'eau et aux ions (Gross, 1957). Ces résultats ont été corroborés, au cours d'une analyse systématique menée sur la cuticule extrabrancheiale chez diverses espèces de crustacés (Lignon, 1987; Lignon et al., 1988; Lignon et Péqueux, 1990). Il en ressort une corrélation claire entre la perméabilité cuticulaire aux ions et la tolérance à la salinité de l'environnement chez les espèces considérées. En fait, les cuticules fines ou calcifiées du corps et de l'intestin postérieur sont 500 à 5000 fois moins perméables chez les osmorégulateurs (*Eriocheir sinensis*, *Astacus leptodactylus*) que chez les osmoconformeurs (*Maia squinado*, *Homarus gammarus*). Ces cuticules sont aussi de 50 à 300 fois moins perméables que la cuticule des branchies. Cependant, la cuticule des branchies chez les osmorégulateurs est moins perméable que la carapace du corps chez les osmoconformeurs (Avenet et Lignon, 1985; Lignon et al., 1988 et 1989; Lignon et Péqueux, 1989; Péqueux et Lignon, 1989). Ainsi, chez l'écrevisse *A. leptodactylus* et l'araignée de mer *M. squinado*, les perméabilités aux ions Na^+ et Cl^- sont, respectivement, 10^{-8} à 10^{-5} cm/S pour la carapace et 10^{-6} à 10^{-3} cm/S pour la cuticule des branchies (Lignon et Péqueux, 1990). On peut conclure de ces études que la perméabilité de la cuticule du corps est suffisamment faible pour limiter les échanges ioniques.

Le tube digestif

Les informations sur le rôle joué par le tube digestif dans l'osmorégulation sont encore partielles chez les crustacés. Comme d'autres invertébrés aquatiques, les crustacés ingèrent du milieu liquide environnant, qui interagit avec leur équilibre osmotique. Cependant, les fonctions multiples de l'intestin et ses caractéristiques ultrastructurales liées à sa fonction dans la nutrition rendent l'évaluation de son rôle dans l'osmorégulation difficile, puisque les deux processus peuvent être liés. Du point de vue morphologique, de nombreux rapports indiquent que les cellules des différentes parties de l'intestin sont typiques des épithéliums transporteurs d'ions (absorption ou sécrétion). Dans certains cas, des preuves physiologiques plus directes soutiennent l'idée que des parties de l'intestin peuvent être impliquées dans les mouvements ioniques et hydriques (Heeg et Cannone, 1966; Mantel, 1968; Farmer, 1980; Holliday et al., 1980; Palackal et al., 1984).

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que l'absorption d'eau par l'intestin chez les hypo-osmoregulateurs tels que le copépode *Acartia tonsa* (Farmer, 1978 et 1980) ou l'artémie

Artemia salina (Croghan, 1958) est étroitement liée aux mouvements transépithéliaux de Na^+ et de Cl^- (Croghan, 1958; Green et al., 1959; Dall, 1967; Geddes, 1975; Ahearn et al., 1977; Ahearn et Tornquist, 1977; Ahearn, 1978 et 1980). Egalement chez des hypo-osmoregulateurs, plusieurs travaux suggèrent que l'intestin est le site d'excrétion active de sel (Green et al., 1959; Dall, 1967; Towle, 1981).

Les organes excréteurs

Les glandes antennaires représentent les organes excréteurs urinaires chez les crustacés décapodes. Elles interviennent dans la régulation de la composition et du volume de l'urine et donc indirectement des fluides extracellulaires. Elles peuvent également intervenir dans la régulation de la concentration de certains solutés organiques ou inorganiques, et plus particulièrement des ions divalents, tels que le Mg^{2+} , Ca^{2+} , et SO_4^{2-} (Prosser et al., 1955; Baldwin et Kirschner, 1976). Leur rôle dans l'osmorégulation est surtout important en milieux dilués par la production d'une urine abondante et hypotonique chez certaines espèces telles que les écrevisses et les gammaridés d'eau douce et saumâtre, espèces chez lesquelles elles participent à la réabsorption de NaCl (Hiroi et al., 2005 ; Freire et al., 2008). Un tel mécanisme n'a jamais été montré chez des espèces de crustacés marins. Même chez les espèces hyper-osmorégulatrices estuariennes, la contribution des glandes antennaires à l'équilibre ionique total semble être minime (Towle, 1981; Mantel et Farmer, 1983).

Du point de vue morphologique, la glande antennaire (paire) des crustacés est composée de trois régions différentes, essentiellement le coelomosac, un canal excréteur qui peut être plus ou moins complexe lorsqu'il est subdivisé en labyrinthe, et un conduit de sortie, éventuellement relié à une vessie urinaire. Chez les amphipodes, les mysidacés, les euphausiacés et les décapodes, les canaux urinaires s'ouvrent sur le métamère antennaire, tandis que chez les crustacés inférieurs et certains malacostracés, les ouvertures sont sur les segments maxillaires (Mantel et Farmer, 1983), d'où les dénominations respectives de glandes antennaires et maxillaires.

Le volume d'urine produit par de nombreux crabes et le taux de production d'urine augmente de façon linéaire avec la dilution du milieu environnant (Kirschner, 1979 ; Péqueux, 1995). La nature du signal qui détermine les changements dans les taux de production d'urine n'est pas encore claire. Une asynchronisation a été signalée entre l'évolution de la production d'urine, les réajustements de la perméabilité de l'organisme à l'eau, et les modifications des conditions internes. Certains crustacés semblent être en mesure d'anticiper les changements internes et d'ajuster leurs systèmes de régulation afin qu'ils soient prêts à faire face à une nouvelle

salinité externe (Spaargaren, 1974; Norfolk, 1978). Cela suggère la mobilisation des médiateurs chimiques en réponse à la perception des changements de salinité.

Les cavités branchiales

Les cavités branchiales (paires) des crustacés décapodes sont limitées du côté interne par la pleure et du côté externe par un repli dorsolatéral de la cuticule appelé branchiostégite. Elles sont ouvertes ventralement vers l'extérieur ce qui permet leur remplissage par l'eau environnante. Elles abritent les branchies et d'autres structures dénommées épipodites qui peuvent être plus ou moins développées selon les espèces. Les épipodites et les branchiostégites peuvent participer à l'osmorégulation. L'implication de ces deux organes n'est pas forcément simultanée ou permanente au cours du développement de l'animal (Bouaricha et al., 1994; Lignot et al., 1999; Lignot and Charmantier, 2001; Cieluch et al., 2004; Cieluch et al., 2005; Lignot et al., 2005 ; Charmantier et al., 2009).

Au niveau de la cavité branchiale, outre leur activité respiratoire, les branchies sont le principal site des échanges ioniques, leur nombre et leur forme augmentant la surface de contact avec le milieu extérieur. Ce tissu multifonctionnel a également un rôle dans l'excrétion des déchets azotés et la régulation acide-base (Burnett et al., 1985; Gilles et Péqueux, 1985; Henry et Wheatly, 1992; Taylor et Taylor, 1992; Péqueux, 1995 ; Freire et al., 2008). Chez certaines espèces, les branchies peuvent avoir des rôles bien distincts en fonction de leur localisation; ainsi, chez les crabes brachyours, les branchies postérieures sont impliquées fortement dans l'osmorégulation alors que les branchies antérieures ont plus un rôle dans les mécanismes de respiration (Siebers et al., 1982; Flick et Haond, 2000; Castilho et al., 2001; Lucu et Towle, 2003; Torres et al., 2007).

3. Structure et organisation des branchies chez les crevettes palaemonidae

Le nombre de paires de branchies varie entre les différents taxons, et constitue ce qu'on appelle la formule branchiale. Selon l'emplacement de l'insertion des branchies, on peut distinguer trois types de branchies ; pleurobranchies, arthrobranchies et podobranchies. Le degré d'amplification de la surface des branchies diffère également entre les groupes, et donne une autre classification en phyllobranchies, trichobranchies et dendrobranchies. Une fine cuticule couvre toutes les surfaces des branchies.

Les crevettes palaemonidae et les crabes brachyours et anomours possèdent des phyllobranchies sur les deux côtés d'un raphé central (Fig. 6). Dans les phyllobranchies de crevettes palaemonidae, un ou plusieurs axes de symétrie peuvent être présents. En plus de la symétrie bilatérale sur l'axe dorso-ventral longitudinal, également vu dans les branchies de crabe, les branchies des crevettes palaemonidae sont à peu près symétriques sur les deux côtés du plan antéro-postérieur médian, où les vaisseaux hémolymphatiques sont insérés. Le raphé contient deux vaisseaux efférents et un vaisseau afférent connectés *via* deux rangées de lamelles. L'épithélium lamellaire se compose de cellules piliers. Les bases des cellules piliers jouxtent les cellules du septum intra-lamellaire ou les cellules septales qui divisent horizontalement la lamelle en deux compartiments symétriques, formant un système de lacunes à travers lesquelles circule l'hémolymphe.

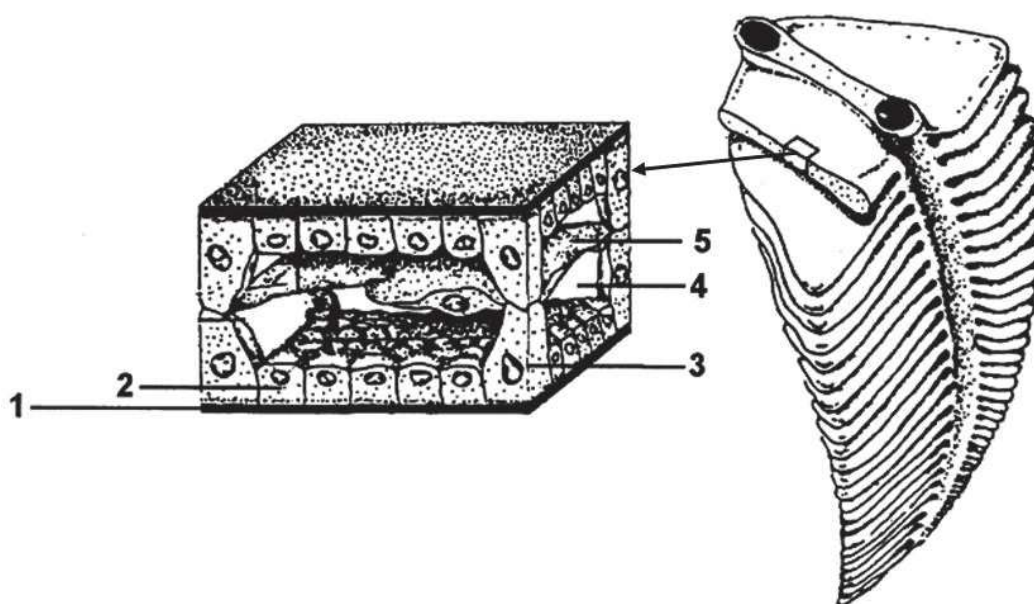


Fig. 6 : Représentation schématique de la morphologie et de la structure des phyllobranchies. 1 : cuticule, 2 : expansions latérales des cellules piliers, 3 : cellules piliers, 4 : lacunes hémolymphatiques, 5 : cellules septales (Onken et Riestenpatt, 1998).

4. Régulation ionique au niveau cellulaire

Sur le plan cellulaire, les branchies mais aussi les autres organes osmorégulateurs possèdent des cellules spécialisées dans les transports ioniques actifs appelées « ionocytes ». Elles sont caractérisées par leur grande taille (10 à 20 μm) et par un important système de longues invaginations au niveau de la membrane plasmique associées à un grand nombre de mitochondries (Freire et al., 2008).

Sur les plans fonctionnel et moléculaire, les transports actifs transépithéliaux nécessitent la présence de voies transcellulaires (apicales et basolatérales) et paracellulaires. Les échanges par voie transcellulaire sont assurés par la présence de protéines transmembranaires dont l'expression et la localisation peuvent être modifiées en fonction de la salinité. La Na^+/K^+ ATPase (NKA) est considérée comme le principal transporteur ionique (Lucu et Towle, 2003). Cette enzyme, forte consommatrice d'énergie (ATP fournie par les mitochondries), génère un gradient électrochimique par transport actif de 3 ions Na^+ du cytoplasme vers l'hémolymph, en échange de 2 ions K^+ . Ce gradient entraîne d'autres échanges ioniques grâce à d'autres transporteurs ou canaux ioniques. La fonction sécrétrice ou absorbante d'un ionocyte dépend donc de la nature et de la localisation de ces transporteurs. De plus, des travaux sur plusieurs groupes d'organismes (crustacés, poissons, insectes) suggèrent que la pompe à proton V-type H^+ ATPase (VHA), qui est une protéine impliquée dans la régulation acido-basique de la cellule, peut également être impliquée dans les transports ioniques. Son rôle a surtout été montré en eau douce ; en position apicale, elle transporte des protons de la cellule vers le milieu externe, créant un gradient électrique qui permet l'absorption de cations, en particulier le Na^+ , *via* des canaux spécifiques comme le canal à sodium (ENaC= Epithelial Na^+ Channel) (Piermarini et Evans, 2001 ; Tsai et Lin, 2007 ; Huang et al., 2010 ; Lee et al., 2011). D'autres transporteurs sont impliqués dans l'absorption de Cl^- comme l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Certains de ces effecteurs ont été étudiés et localisés chez les crustacés, notamment chez les crabes brachyours (Martinez et al., 2005 ; Bianchini et Wood, 2008). Par contre chez les crevettes palaemonidae, très peu d'études y ont été consacrées.

Dans le cadre de mon travail de thèse, la mise en évidence de ces différents effecteurs de l'osmorégulation (localisation cellulaire, expression génique, type de régulation) chez *Macrobrachium spp.*, entre une espèce d'eau douce confinée à l'intérieur des terres (P : *M. pantanalense*) et une espèce qui effectue des migrations vers l'estuaire (A : *M. amazonicum*) constitue une approche contribuant à expliquer les différences de capacités osmorégulatrices observées entre A et P.

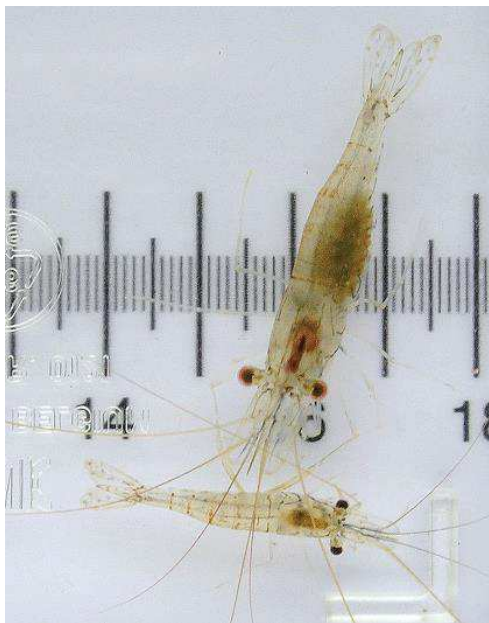
De plus, la caractérisation d'effecteurs impliqués dans l'osmorégulation à différents stades ontogénétiques devrait permettre d'élucider les bases cellulaires et moléculaires des capacités osmorégulatrices au cours du développement. Cette analyse pourrait ainsi nous permettre de comprendre comment *M. amazonicum* et *M. pantanalense* ont mis en place différents mécanismes de régulation ionique en fonction de la salinité de leurs habitats.

CHAPITRE II.

Matériel et méthodes



Femelle ovigère de *M. amazonicum*



(Dos Santos et al., 2013)

M. pantanalense

Haut : femelle ovigère, bas : mâle

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel Biologique :

Deux espèces de crevettes ont été étudiées: *Macrobrachium amazonicum* (A) et *Macrobrachium pantanalense* (P) :

Position systématique actuelle des deux espèces de *Macrobrachium* (dos Santos et al., 2013) :

Embranchement	Arthropoda
Ordre	Decapoda
Infra-ordre	Caridea
Famille	Palaemonidae (Rafinesque, 1815)
Genre	Macrobrachium (Spence Bate, 1868)
Espèce	<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Heller, 1862) <i>Macrobrachium pantanalense</i> (nov. sp.)

Macrobrachium amazonicum (A) est une crevette d'eau douce largement distribuée en Amérique du Sud (Montoya, 2003) (Fig. 3). Cette espèce a un cycle de vie diadrome ; les adultes vivent dans l'eau douce des rivières côtières du delta de l'Amazonie dans le nord du Brésil. Lors de la reproduction, les femelles migrent vers l'estuaire où ont lieu l'éclosion des larves et leur développement. Après la métamorphose les juvéniles font une migration inverse et retournent en eau douce (Fig. 7) (Guest, 1979 ; Charmantier et Anger, 2011).

Macrobrachium pantanalense (P) vit dans le Pantanal (Fig. 3) confinée à l'intérieur des terres, passant tout son cycle de vie dans des habitats d'eau douce (ED) du sud-ouest du Brésil (Fig. 7) (Anger et Hayd, 2010 ; Charmantier and Anger, 2011).

Chez les deux espèces le développement post-embryonnaire comporte des stades larvaires, environ 6 à 7 stades zoés chez A et 12 à 15 stades zoés chez P, un nombre variable de décapodites (de 3 à 5 chez A) avant la phase juvénile qui suit la métamorphose (Fig. 7) (Anger et al., 2009, Anger et Hayd, 2010).

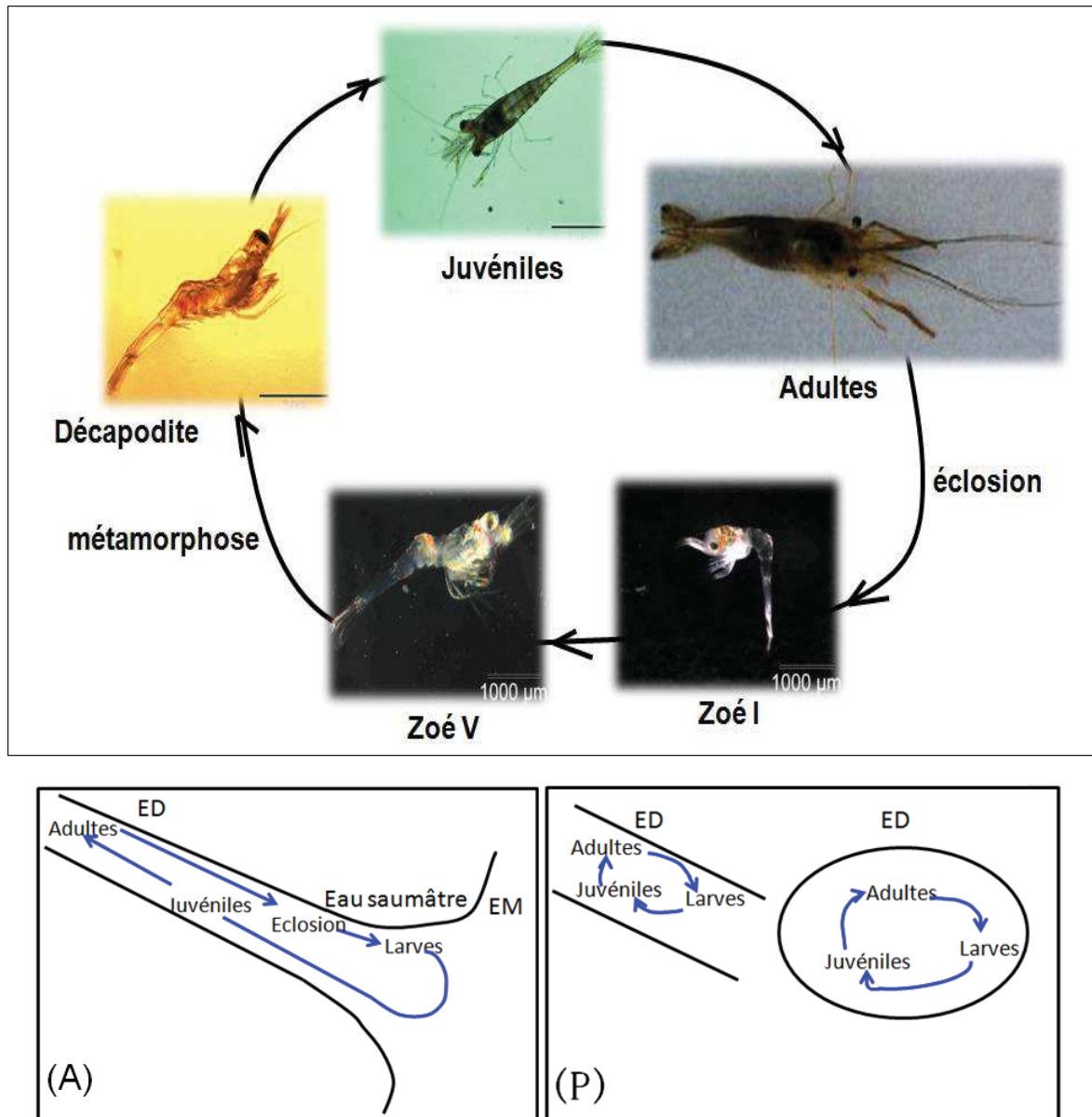


Fig. 7 : Cycle de vie de *M. amazonicum* (A) et *M. pantanalense* (P) (Charmantier et Anger, 2009).

2. Elevage et maintenance des animaux:

Les adultes de *M. amazonicum* et *M. pantanalense* ont été obtenus de l'Université de Mato Grosso do Sul en Aquidauana (Mato Grosso do Sul, MS, Brésil ; pour plus de détails, voir Anger et Hayd, 2010) et importées à la Station Marine de Helgoland par le Dr. Klaus Anger (Alfred Wegener Institut (AWI), Allemagne). La licence d'exportation a été délivrée le 12-10-2007 par l'Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Brasília, Brésil).

À la station marine de Helgoland, les 2 espèces de crevettes (A et P) ont été élevées en eau douce (ED : 0,2 ppt; température de 24°C). Les crevettes adultes ont été nourries avec des morceaux d'isopodes marins décongelés (*Idotea spp.*) et de l'alimentation pour aquariophilie (Novo Tab, JBL). Les femelles ovigères ont été maintenues dans des aquariums aérés de 30 l d'ED et les larves nouvellement écloses ont été recueillies dans des tamis (0,3 mm de maillage), puis élevées dans des béciers contenant 1 l d'eau aérés à 29°C avec un cycle de 12:12 h lumière : obscurité. Les larves zoés, qui passent de la lécithotrophie à l'hétérotrophie vers la fin de la phase larvaire, ont été nourries lorsque nécessaire avec des nauplii d'*Artemia* fraîchement écloses (Anger et Hayd, 2010). De génération en génération, les larves de *M. amazonicum* ont été élevées dans une eau d'une salinité d'environ 20 ppt jusqu'à la métamorphose, correspondant ainsi à l'exposition en eau salée qui leur est nécessaire, réalisée dans la nature lors de la migration ontogénétique vers les estuaires. Par contre, tous les stades de *M. pantanalense* ont été élevés en ED.

3. Expositions expérimentales à la salinité:

Les stades larvaires des deux espèces (zoé I, zoé V et décapodite) ont été acclimatés pendant 24 heures soit à 5 ppt soit à 25 ppt, les deux milieux étant préparés par dilution d'eau de la Mer du Nord (environ 30-32 ppt) avec de l'eau déminéralisée. Les juvéniles de trois semaines et de deux mois ont été progressivement transférés à l'ED (salinités 5, 2, 0,2 ppt) ou à l'eau de mer diluée (20 ppt) où ils ont été maintenus pendant 2 semaines. Ces stades ontogénétiques ont été choisis de telle sorte que l'ensemble soit représentatif de la mise en place et de la différenciation des organes impliqués dans l'adaptation à la salinité (glande antennaire et cavité branchiale) en plus des différences déjà observées dans les capacités osmorégulatrices entre les deux espèces (Charmantier et Anger, 2011).

4. Méthodes d'expérimentations:

Les différentes techniques utilisées au cours de ce travail de thèse couvrent plusieurs niveaux d'organisation biologique (approche intégrative) allant de l'organisme aux gènes. Ces techniques sont décrites en détail dans les publications correspondant aux différents chapitres. À titre de résumé, elles sont également rassemblées dans le Tableau 2 où sont exposés les objectifs propres à chacune d'elles.

Tableau 2: Synthèse et objectifs des techniques utilisées

Techniques	Objectifs	Niveaux d'intégration	Chapitres concernés
Microscopie électronique à balayage	Etudier l'organisation générale des organes osmorégulateurs	Organes	Chap. III
Histologie (colorations topographiques)	Observer la mise en place des différents sites osmorégulateurs au cours de l'ontogenèse	Tissus	Chap. III
Microscopie électronique à transmission	Etudier l'ultrastructure des organes osmorégulateurs	Cellules	Chap. IV
Immunocytochimie (simple et double marquage immunologique)	Déterminer la localisation ou la co-localisation des protéines dans les tissus osmorégulateurs	Tissus et Protéines	Chap. III, Chap. IV et Chap. V
Immunogold	Déterminer la localisation ultrastructurale des protéines	Cellules et protéines	Chap. IV
Western blot	Vérifier la spécificité d'un anticorps	Protéines	Chap. IV et Chap. V
Séquençage	Déterminer la séquence nucléotidique d'un ADNc spécifique	Gènes	Chap. V
qRT-PCR	Quantifier l'expression génique	Gènes	Chap. V

CHAPITRE III.

**Ontogenèse des organes osmorégulateurs
chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense***

Chapitre III : Ontogenèse des organes osmorégulateurs chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense*¹

1. Travaux antérieurs:

Plusieurs études ont été menées sur l'ontogenèse de l'osmorégulation et la tolérance à la salinité chez diverses espèces (Charmantier, 1998). Toutefois, les travaux sur l'ontogenèse des tissus osmorégulateurs et leurs variations potentielles au cours du développement sont encore limités (Hong, 1988; Bouaricha et al., 1994; Charmantier, 1998; Anger, 2001; Lignot et Charmantier, 2001). Parmi les quelques espèces chez lesquelles l'ontogenèse des épithéliums transporteurs d'ions a été étudiée par des analyses histologiques et/ou de microscopie électronique figurent *Farfantepenaeus aztecus* (Talbot et al., 1972), *Callinassa jamaicensis* (Felder et al., 1986), *Penaeus japonicus* (Bouaricha et al., 1994), *Homarus gammarus* (Lignot et Charmantier, 2001) et *Crangon crangon* (Cieluch et al., 2005). Ces études ont permis de montrer que dans certains cas la localisation des tissus osmorégulateurs pouvait varier au cours du développement et donc être différente chez les larves, post-larves, juvéniles et adultes. Ainsi chez les larves de *C. jamaicensis*, *P. aztecus* et *P. japonicus*, les branchies sont absentes ou peu développées et les tissus osmorégulateurs sont alors localisés au niveau des parois des chambres branchiales, pleurites et branchiostégites. Chez *P. japonicus* (Bouaricha et al., 1994), il a été clairement montré que la localisation des sites osmorégulateurs change au cours du développement. Chez les post-larves, ces sites sont localisés sur les branchiostégites et les épipodites alors que chez les adultes ils sont localisés sur les épipodites et les branchies. Les branchiostégites et les pleures participent donc à l'osmorégulation au cours des stades précoces pendant lesquels les organes osmorégulateurs définitifs, branchies et épipodites, sont en cours de développement.

Sur le plan technique, les premiers travaux ont utilisé des méthodes histologiques, suivies d'observations en microscopie optique ou électronique. La mise à disposition d'anticorps spécifiques et le développement de l'immunolocalisation sont venus en appui décisif et complémentaire à l'histologie. Ainsi, dans les mécanismes de l'osmorégulation, la Na^+/K^+ ATPase (NKA) est l'une des enzymes les plus importantes (Towle, 1981 et 1984 a, b; Péqueux, 1995; Charmantier, 1998; Lucu et Towle, 2003). En utilisant l'ATP comme source

¹ Lors de la rédaction de l'article correspondant, les deux espèces n'étaient pas encore différenciées et il y est donc question de deux populations séparées, celles du Delta de l'Amazonie (A, et dorénavant *M. amazonicum*) et du Pantanal (P, *M. pantanalense*).

d'énergie, elle permet un transport actif d'ions à travers les membranes épithéliales (Neufeld et al., 1980; De Renzis et Bornancin, 1984). L'immunolocalisation de la NKA en utilisant des anticorps monoclonaux a été utilisée comme un outil pour identifier les épithéliums transporteurs d'ions chez les deux espèces de *Macrobrachium*, comme chez de nombreux poissons (Evans et Claiborne, 2009) et d'autres espèces de crustacés tels que l'isopode terrestre *Porcellio scaber* (Ziegler, 1997), le homard *Homarus gammarus* (Lignot et al., 1999; Lignot et Charmantier, 2001), et l'écrevisse *Astacus leptodactylus* (Barradas et al., 1999) (Charmantier et al., 2009).

Comme mentionné ci-dessus, les organes de la cavité branchiale ont un rôle dans la fonction osmoréglatrice. Chez les crustacés décapodes, les glandes antennaires y participent également en produisant une urine hypotonique, mais uniquement chez certaines espèces d'ED. Leur structure et leur fonction ont été étudiées chez les crustacés, dont ceux d'ED comme les écrevisses (Khodabandeh et al., 2005a, b). Les glandes antennaires sont composées de trois compartiments : 1) le coelomosac, 2) la vessie et 3) le tubule collecteur proximal et distal (Freire et al., 2008). Chez *Homarus gammarus*, aucun immunomarquage à la NKA n'a été détecté dans les cellules du coelomosac. D'autres études concernant l'activité de la NKA dans les glandes antennaires de *Procambarus clarckii* et de *P. blandengi* ont montré que le coelomosac présente la plus faible activité de la NKA par rapport aux autres parties des glandes antennaires (Peterson et Loizzi, 1975), ce qui est lié à sa fonction de site d'ultrafiltration de l'hémolymphe. Sur le plan ultrastructural, les cellules épithéliales du tubule collecteur et de la vessie présentent des microvillosités apicales ainsi que des invaginations de la membrane cytoplasmique basale en association étroite avec des mitochondries. La NKA est également localisée au niveau de ces deux compartiments des glandes antennaires. La présence de la NKA et d'une ultrastructure typique des épithéliums transporteurs d'ions suggère que le tubule collecteur et la vessie sont impliqués dans les échanges ioniques. Chez les écrevisses, la fonction principale du tubule collecteur est la réabsorption d'ions à partir du filtrat, ce qui conduit à la production d'urine hyposmotique ; c'est une adaptation clé à la faible concentration ionique de l'ED puisqu'elle limite les pertes ioniques au niveau de l'organisme (Peterson et Loizzi, 1974; Sesma et al., 1983 ; Fuller et al., 1989; Khodabandeh et al., 2005a). Ce compartiment n'est pas fonctionnellement nécessaire chez les espèces marines comme *H. gammarus*, qui produisent une urine isotonique par rapport à l'hémolymphe (Dall, 1970).

2. Résultats personnels:

L'article correspondant (Article 1) "Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs" est joint à la fin de ce paragraphe.

Ce travail a été consacré à l'étude comparative de l'ontogenèse des organes osmorégulateurs chez les deux espèces de *Macrobrachium*, *M. amazonicum* et *M. pantanalense* (dans l'article correspondant, ces deux espèces sont dénommées : population A = *M. amazonicum* et population P = *M. pantanalense*). La structure de la cavité branchiale et de la glande antennaire a été étudiée chez les deux espèces aux stades zoé I (juste après l'éclosion), zoé V (avant la métamorphose), décapodite (au cours de la métamorphose) et juvénile de 3 semaines. Pour attester de l'implication des organes de la cavité branchiale (branchies, branchiostégites et épipodites) mais aussi de la glande antennaire dans l'osmorégulation, la NKA a été localisée au niveau de ces organes par immunofluorescence au cours de l'ontogenèse. Nous avons également testé l'effet d'une salinité faible (0,2 ppt, soit l'ED, ou 5 ppt) et d'une salinité élevée (25 ppt) sur l'expression et la localisation tissulaire de cette protéine.

Structure de la cavité branchiale et de la glande antennaire au cours de l'ontogenèse:

Cavité branchiale: Au stade zoé I, on observe une absence complète des branchies chez les deux espèces A et P. Au stade zoé V, les deux espèces présentent des différences structurales. Les branchies de l'espèce A présentent une structure très simple, sous forme d'un bourgeon branchial massif, alors que celles de l'espèce P présentent des lamelles déjà bien différenciées. A ce stade, il y a aussi les épipodites qui apparaissent comme des petits bourgeons chez les deux espèces. Au stade décapodite, les lamelles branchiales de l'espèce A commencent à être visibles ; elles sont donc comparables morphologiquement à celles de l'espèce P. A ce stade, la taille des épipodites augmente chez les deux espèces. Chez les juvéniles, les branchies, au nombre de 8 paires, ont une structure classique de phyllobranchie généralement trouvée chez les crabes et les crevettes caridae ; cette structure est similaire chez les deux espèces. Les épipodites sont aussi plus longs et bien développés chez les deux espèces.

Glande antennaire: Deux glandes antennaires sont présentes chez les deux espèces (A et P), situées ventralement à la base des antennes et des deux côtés du système nerveux central. Au stade zoé I, les glandes présentent des structures tubulaires simples et une petite vessie. Au stade zoé V, la vessie a une plus grande lumière, tandis que les tubules ne présentent pas de différenciation morphologique. Certaines cellules du coelomosac sont en contact étroit avec la vessie. Au cours du développement larvaire, les tubules augmentent de diamètre et de longueur, et présentent des replis et des invaginations. Chez les décapodites, deux sections tubulaires différentes sont observées, correspondant aux tubules proximaux et distaux. Chez les juvéniles, la taille des glandes augmente. Le coelomosac bien développé est placé entre la vessie et les tubules collecteurs. Les invaginations des tubules augmentent en nombre.

Localisation de la NKA au niveau des organes osmorégulateurs en milieu de faible (5 ppt) et forte salinité (25 ppt):

Cavité branchiale : La NKA est immunolocalisée au niveau de la cavité branchiale aux salinités 5 et 25 ppt aux stades zoé I, zoé V, décapodite, juvénile de 3 semaines et juvénile de 2 mois. Au stade zoé I, un immunomarquage indiquant la présence de NKA a été observé chez les deux espèces (A et P) au niveau de l'épithélium interne du branchiostégite. Les mesures d'intensité de fluorescence, qui ont été faites sur des photos issues de 3 animaux différents, n'ont révélé aucune différence significative d'intensité de marquage du branchiostégite entre les deux espèces au stade zoé I. A partir du stade zoé V, où les branchies sont plus développées chez l'espèce P que chez l'espèce A, nous avons observé des différences significatives d'intensité d'immunomarquage de la NKA entre les deux espèces. Chez l'espèce A, la NKA est faiblement marquée au niveau des lamelles branchiales, et est plus fortement marquée au niveau de l'épithélium interne du branchiostégite. Chez l'espèce P, la situation est inversée avec un immunomarquage fort au niveau des lamelles branchiales et un marquage faible sur le branchiostégite. Au stade décapodite, on observe les épipodites qui sont marqués à la NKA chez les deux espèces. Concernant le branchiostégite et les branchies, les mêmes différences d'intensité du marquage de la NKA qu'au stade zoé V ont été observées entre les deux espèces. Au stade juvénile, le branchiostégite, les épipodites et les lamelles branchiales présentent un fort immunomarquage pour la NKA chez les deux espèces. Chez les juvéniles de 2 mois, aucune différence significative n'a été observée dans l'immunomarquage des branchies et des épipodites entre les espèces en ED (0,2 ppt) ainsi qu'en fonction de la salinité (0,2 et 25 ppt) chez l'espèce A. Cependant, une différence significative d'immunomarquage a été observée entre salinités au niveau du branchiostégite

chez l'espèce A où l'épithélium interne présente un marquage plus intense à 25 ppt qu'en ED. Ces comparaisons n'ont pas pu être effectuées chez l'espèce P puisque celle-ci, entièrement dulçaquicole, ne tolère pas la salinité de 25 ppt.

Glande antennaire: Aux stades zoé I et zoé V, la NKA a été localisée dans la partie basale du tubule collecteur et dans la vessie, sans différence visible entre les espèces ou les salinités. Au stade décapodite, le côté basal du tube distal présente un faible immunomarquage. Cependant, au niveau des cellules du tubule proximal, l'immunomarquage est plus fort. La partie basale des cellules de la vessie a été uniformément immunomarkuée. Au stade juvénile, la NKA a été localisée dans les trois régions de la glande antennaire (tubules proximaux et distaux et la vessie). Aucun immunomarquage n'a été détecté dans le coelomosac quelque soit le stade analysé. Aucune différence entre espèces n'a été observée dans l'immunomarquage des différentes parties de la glande antennaire, ce qui se traduit par une capacité similaire chez les juvéniles des deux espèces à produire une urine hypotonique, comme nous avons pu le démontrer chez des animaux acclimatés à l'ED.

Résumé:

- Le développement branchial de *M. pantanalense* est plus hâtif que celui de *M. amazonicum*, ce qui pourrait être une adaptation à l'hyper-osmorégulation précoce et donc au cycle entièrement limnique de *M. pantanalense*.
- Le branchiostégite est impliqué dans l'osmorégulation dès l'éclosion au stade zoé I.
- La NKA est essentiellement localisée au niveau des branchies chez *M. pantanalense* et au niveau des branchiostégites chez *M. amazonicum* aux stades zoé V et décapodite. Ceci suggère que la forte capacité d'hypo-osmorégulation des premiers stades ontogénétiques de *M. amazonicum* est liée aux transports ioniques dans les branchiostégites, tandis que les lamelles branchiales ne sont pas complètement développées.
- L'immunomarquage de la NKA est plus fort à 25 ppt par rapport à l'ED au niveau du branchiostégite chez les juvéniles de 2 mois de *M. amazonicum*. Ceci suggère que les branchiostégites sont chez cette espèce impliqués dans l'hypo-osmorégulation à forte salinité, et que l'épithélium interne du branchiostégite a une fonction sécrétrice. Ce résultat confirme le précédent obtenu chez des stades larvaires.
- La NKA est également localisée au niveau de la glande antennaire dès l'éclosion au stade zoé I jusqu'au stade juvénile chez les deux espèces ce qui suggère son implication dans l'hyper-osmorégulation dès les stades larvaires chez les deux



Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Lorin-Nebel C., Elgero C., Grousset E., Anger K.,
Charmantier-Daures M., Charmantier G. (2013).

Cell and Tissue Research. 353: 87-98.

Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs

Nesrine Boudour-Bouchecker · Viviane Boulo · Catherine Lorin-Nebel ·
Camille Elguero · Evelyse Grousset · Klaus Anger ·
Mireille Charmantier-Daures · Guy Charmantier

Received: 19 December 2012 / Accepted: 26 March 2013 / Published online: 25 April 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The ontogeny of osmoregulatory organs was studied in two geographically isolated populations of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*, one originating from the Amazon estuary (A) and the other from inland waters of the Pantanal (P) in northeastern and southwestern Brazil, respectively. A previous investigation had shown that the estuarine population is able to hypo-osmoregulate in seawater, whereas the hololimnetic inland population has lost this physiological function. In the present study, the structural development of the branchial chamber and excretory glands and the presence of Na^+/K^+ -ATPase (NKA) were compared between populations and between larval and juvenile stages after exposure to two salinities representing hypo- and hypertonic environments. In the newly hatched zoea I stage of both populations, gills were absent and NKA was localized along the inner epithelium of the branchiostegite. In intermediate (zoea V) and late larval stages (decapodids), significant differences between the two populations were observed in gill development and NKA expression. In juveniles, NKA was detected in the gills and branchiostegite, with no differences between populations. At all developmental stages and in both populations, NKA was present in the antennal glands upon hatching. The strong hypo-osmoregulatory capacity of the early developmental stages in population A could be linked

to ion transport along the inner side of the branchiostegite; this seemed to be absent or weak in population P. The presence of fully functional gills expressing NKA appears to be essential for efficient hyper-osmoregulation in late developmental stages during successful freshwater adaptation and colonization.

Keywords Osmoregulation · Immunolocalization · Branchial chamber · Antennal gland · Na^+/K^+ -ATPase · Crustaceans · *Macrobrachium amazonicum*

Introduction

The invasion of freshwater (FW) habitats by organisms of marine origin has repeatedly occurred throughout evolutionary time (Lee and Bell 1999). Palaemonid shrimps, especially those belonging to the genus *Macrobrachium*, have been particularly successful in this respect (Freire et al. 2003; Bauer 2004; Augusto et al. 2009; Anger 2013). The most conspicuous adaptation associated with this evolutionary transition has been found in osmoregulatory traits that allow survival in aquatic environments in which ions are less concentrated than in the body fluids of the animal (Mantel and Farmer 1983; Lee and Bell 1999).

Shrimp assigned to the Neotropical species *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) are widely distributed in northern and central South America, ranging over more than 4000 km from the Caribbean coast of Columbia to Paraguay and from the eastern Subandean plains of Peru to the Atlantic coast of Brazil (for recent reviews, see Maciel and Valenti 2009; Anger 2013). *M. amazonicum* is considered as an example of the recent evolutionary invasion of a FW environment, as it shows, not only in estuarine but also in fully limnic inland populations, an extended planktonic larval development with maximum survival at low-salt concentrations (Charmantier and Anger

This work was partially funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS/CNEPRU).

N. Boudour-Bouchecker (✉) · V. Boulo · C. Lorin-Nebel ·
C. Elguero · E. Grousset · M. Charmantier-Daures ·
G. Charmantier

Université Montpellier 2, Equipe Adaptation Ecophysiologique
et Ontogénèse, UMR5119 EcoSyM, UM1-2-CNRS-IRD-Ifremer,
cc 092, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France
e-mail: nboudour@yahoo.fr

K. Anger
Alfred-Wegener-Institut, Biologische Anstalt Helgoland, 27498
Helgoland, Germany

2011). In the present study, the ontogeny of osmoregulatory organs and tissues has been compared between two geographically isolated populations, one originating from the Amazon estuary in northeastern Brazil (A) and the other from the seasonally inundated flood plains of the Pantanal (P) in southwestern Brazil, central South America.

A recent comparative laboratory study (Charmantier and Anger 2011) has revealed, in these two populations, significant differences in the patterns of salinity tolerance and osmoregulation. In the estuarine population A, all ontogenetic stages are strong hyper-osmoregulators in brackish water (salinities of ca. 1–17) and hypo-osmoregulators at higher salinities. Hyper-osmoregulation in FW, however, is absent or weak in the larvae (except for the first postembryonic stage, zoea I) and in early juveniles. This complex pattern is consistent with a diadromous life cycle with hatching in rivers, rapid larval downstream transport to brackish estuarine waters and active upstream migration of later juveniles and adults (Magalhães 1985; Magalhães and Walker 1988; Odinetz Collart 1991; Augusto et al. 2007; Anger 2013). Population P, by contrast, spends its entire life cycle in FW (Anger and Hayd 2010; Hayd and Anger 2013). Consequently, all life-history stages survive in FW, being able to hyper-osmoregulate in FW and under brackish conditions (salinities of 0.2–17). Mortality increases during experimental exposure to higher salinities and no ontogenetic stage is able to survive in seawater. The function of hypo-osmoregulation is completely absent in population P. These differences between estuarine and fully limnic inland shrimps have been interpreted as signs of an initial species diversification attributable to continued genetic isolation of populations A and P probably since the Late Miocene or the Pliocene (Charmantier and Anger 2011; Vergamini et al. 2011; Anger 2013). This makes shrimp belonging to the *M. amazonicum* complex interesting subjects for comparative studies of osmoregulatory features in the context of evolutionary changes occurring during limnic invasions.

In dilute media, an animal that hyper-osmoregulates is faced with a massive osmotic influx of water and with diffusive ion loss. In a concentrated medium, an organism that hypo-osmoregulates faces dehydration and an invasion of ions. Maintenance of hydro-mineral balance is mainly provided by mechanisms of active ion transport between the external environment and the hemolymph (Péqueux 1995; Lucu and Towle 2003; Charmantier et al. 2009). In crustaceans, this balance is ensured by osmoregulatory organs such as the branchial chamber, which is limited inside by the pleurae and outside by the branchiostegite. The branchial chamber houses the gills and epipodites, the extent of the development of the latter depending on the species. The antennal gland, which represents the main excretory organ in decapod crustaceans, contributes to the regulation of the composition and volume of extracellular fluids. Its role is thought to be

important in diluted environments in which abundant and sometimes hypotonic urine is produced (Mantel and Farmer 1983; Freire et al. 2008; Charmantier et al. 2009).

The osmoregulatory organs possess cells that are specialized in active ion transport and are called ionocytes. They are characterized by the presence of apical microvilli and an extensive system of basolateral infoldings associated with numerous mitochondria (Charmantier et al. 2009; Freire et al. 2008). Active transepithelial transport requires the presence of transcellular and paracellular pathways. Transcellular pathways are provided by the presence of transmembrane proteins whose expression and location can change depending on salinity. Na^+/K^+ ATPase (NKA), whose location is basolateral, is considered as the primary ion transporter (Lucu and Towle 2003). This enzyme generates an electrochemical gradient that leads to further ion exchange through other ion channels and transporters that have yet not been identified in *M. amazonicum*.

Most studies of crustacean osmoregulation have been conducted in adults; however, natural selection acts on all stages of development and salinity is one of the environmental factors yielding a selective pressure on crustaceans during their entire life cycle (Charmantier et al. 2009). Investigations of the ontogeny of osmoregulation are thus necessary for a better understanding of the adaptation of a species to its habitat. In the present investigation, we have studied the ontogeny of osmoregulatory organs and tissues in laboratory-reared *M. amazonicum* from the Amazon estuary (A) and the Pantanal (P) in terms of the expression and localization of NKA. Our study focuses on relationships between ontogenetic changes in physiological and morphological traits in relationship to presumable patterns of ontogenetic migrations in FW-invading shrimps.

Materials and methods

Origin and maintenance of animals

Adult *M. amazonicum* of both populations (A and P) were obtained from the State University of Mato Grosso do Sul in Aquidauana (Mato Grosso do Sul, MS, Brazil; for details, see Anger and Hayd 2010). Shrimps were transported in cooling boxes to the Helgoland Marine Biological Laboratory (Germany), where they were kept in FW (total ion concentration: 0.2 mg/l; temperature 24°C; for more details, see Anger et al. 2009; Charmantier and Anger 2011). An export licence was issued on 12-10-2007 by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Brasília, Brazil). Adult shrimp were fed with frozen pieces of marine isopods (*Idotea* spp.) and commercial aquarium food (Novo Tab, JBL). Oviparous females were maintained in aerated flow-through aquaria with 30 l FW. Newly hatched

larvae were collected in sieves (0.3-mm mesh size) receiving the overflowing water and subsequently reared in aerated 1-l beakers kept at 29°C and under a 12:12 h light:dark cycle. Except for the zoea I stage, which is fully lecithotrophic, the larvae were fed with freshly hatched *Artemia* nauplii (Anger and Hayd 2010).

Salinity acclimation

Larval stages (zoeal stages I and V, decapodids) were acclimated for 24 h either to brackish water (5 ppt) or to moderately diluted seawater (25 ppt). Three-week-old and 2-month-old juveniles (referred to as early and late juveniles) were stepwise transferred to FW (salinities 5, 2, 0.2 ppt) or to diluted seawater (20 ppt) in which they were maintained for 2 weeks. These stages were chosen because of previously observed differences in their osmoregulatory capacities (Charmantier and Anger 2011). After acclimation, all shrimp were anesthetized by speed freezing and then fixed (see below).

Histological preparations

For light microscopy, anesthetized animals were fixed in Bouin's fixative for 24 h, rinsed several times in 70% ethanol and dehydrated in an ascending series of ethanols (95%, 100%). After impregnation in butanol, histochoice clearing agent [Amersco, USA] and Paraplast [Sigma-Aldrich, USA]), the samples were embedded in Paraplast. Transverse and longitudinal sections (4 µm thick) were taken with a Leitz microtome (Wetzlar) and mounted on glass slides treated with poly-L-lysine. Dry slides were stained with Masson Trichrome and observed on a Leica Diaplan light microscope.

Immunolocalization of Na⁺/K⁺ ATPase (NKA)

Slides were dewaxed (LMR), rehydrated through a descending series of ethanols (100%, 95%, 90%, 70%, 50%) and then washed in phosphate-buffered saline (PBS). Slides were incubated in sodium citrate buffer and then microwaved (at 80% power twice for 1 min) to reveal the antigenic sites. After being cooled at room temperature, the slides were immersed for 10 min in a mixture of 0.01% Tween 20, 150 mM NaCl in 10 mM PBS, pH 7.3. Tissue saturation was performed by incubation in a solution of 5% skimmed milk (SM)/PBS for 20 min. Following three washes in PBS, the slides were incubated for 2 h at room temperature in a moist chamber with the rabbit polyclonal NKA primary antibody (SantaCruz Biotechnology, Cliniscience) at 8 µg/ml in 0.5% SM/PBS. The specificity of this antibody has been tested previously by Western blot in the shrimp *Litopenaeus stylirostris* (D. Pham, personal communication). Following washes, the slides were

incubated with the secondary antibody (AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen) at 10 µg/ml in 0.5% SM/PBS for 1 h at room temperature. Control slides were exposed to the same conditions without primary antibody. Slides were mounted in an anti-bleaching mounting medium (Gel/Mount, Permanent Aqueous Mounting, Biomed, Plovdiv, Bulgaria) and observed with a Zeiss Axioimager microscope equipped with a special filter for fluorescence (380 nm to 770 nm) and AxioVision 4 software. The average pixel intensity of fluorescence was quantified in the branchiostegite from three different animals (5 measurements per micrograph) by using public domain ImageJ software in all studied developmental stages and in both populations. This quantification was not conducted in gills because of fluorescence heterogeneity.

Scanning electron microscopy

Branchial chambers from juveniles of population A were maintained in 70° ethanol and dehydrated through an ethanol series and a 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane bath. After being air-dried, samples were observed with a Quanta FEG 200 (FEI, the Netherlands) equipped with an X-MAX EDS detector (Oxford Instruments).

Statistical analysis

A comparison of mean values of pixel intensity was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) after appropriate checks for normality (Shapiro test), homoscedasticity (Breusch-Pagan test) and independence of variance (Durbin-Watson test) by using the statistical software R version 2.8.1. The significance level of *P*-values was set at *P*<0.05. When a significant effect was detected by ANOVA, post hoc comparisons between mean values were performed by using the Tukey test.

Results

Ontogeny of osmoregulatory structures

Branchial chamber The general organization of the branchial chamber of *M. amazonicum* is similar in adult and late juvenile shrimp (Fig. 1). Each branchial chamber contains eight phyllobranchiate gills and three small epipodites associated with each maxilliped.

The ontogeny of osmoregulatory structures was followed in zoeal stages I and V, decapodids and juveniles.

At the zoea I stage, no gills or epipodites have yet developed in either population A or population P (Fig. 2a). The branchial chamber is bordered inside by the pleurae and outside by the branchiostegite (Fig. 2a), which comprises



Fig. 1 Scanning electron micrograph of the left branchial chamber of a late juvenile stage from the Amazon population of *Macrobrachium amazonicum*. The branchiostegite has been cut to reveal the eight phyllobranchiate gills and the epipodites. One of the eight gills is not visible because it lies behind the second gill (e epipodite, f filaments, g gills, s scaphognatite). Bar 2 mm

two opposing epithelia between which a voluminous central hemolymph lacuna can be found. This structure of the branchiostegite persists in later developmental stages.

In the zoea V stage, the two populations exhibit structural differences. In population A, gills are represented by massive buds (Fig. 2b), whereas in population P, they are differentiated, bearing developed lamellae (Fig. 2b'). At this stage, the epipodites appear in both populations as small buds (not shown).

By the decapodid stages, the gill lamellae of both populations have developed with no noticeable differences between them (Fig. 2c). In both populations, the epithelium of the gill lamellae appears undifferentiated and contains only a few nuclei. The epipodites of the two populations appear longer than those at the zoea V stage (not shown).

In 3-week-old juveniles, all eight pairs of gills have developed and the gill lamellae are attached along the two outer faces of a triangular gill shaft (Fig. 2d). The epithelium within the lamellae is composed of complex epithelial cells with a thick axial zone containing a voluminous round or oval central nucleus. Thin lateral expansions extend under the thin cuticle and limit two rows of hemolymph lacunae in which few hemocytes are present (Fig. 2e).

No apparent difference in structure is notable between the different lamellae along the gill axis or between the anterior and posterior gills (Fig. 2d). The branchiostegites show the same structure as in previous stages, with two epithelia separated by voluminous hemolymph lacunae (Fig. 2f). The epipodites in both populations are well developed, becoming longer and biramous, with two thick epithelia that contain large oval nuclei. The two epithelia are separated by an axial hemolymph lacuna that develops progressively (Fig. 2g).

Antennal glands Two antennal glands are present in the zoea I stage, located ventrally at the basis of the antennae and on both sides of the central nervous system. Their location remains similar throughout subsequent development. The glands show simple tubule-like structures and a small bladder (Figs. 3a, a'). In the zoea V stage, the bladder has a larger lumen (Fig. 3b), whereas the tubule does not present any morphological differentiation. Some cells of the coelomosac are in close contact with the bladder. During the course of larval development, the tubules increase in diameter and length, becoming folded and differentiated. In the decapodid stages, two different tubule sections are observed, corresponding to the proximal and distal tubules (Fig. 3c). In juveniles, the size of the glands increases (Fig. 3d, e). The well-developed coelomosac is positioned between the dorsal bladder, which presents a large lumen and centrally located tubules (Fig. 3e). The foldings of the tubule increase in number. The proximal tubule, which is located in a ventral position, contains few nuclei. The distal tubules, located close to and below the coelomosac, present numerous nuclei that appear more strongly stained (Fig. 3e).

Immunolocalization of NKA

Branchial chamber Control sections without the primary antibody showed no immunolabeling (not shown). In all studied developmental stages, except in late juveniles, no visible difference in NKA immunostaining was observed between salinities irrespective of the population or organ analyzed. We therefore present the results at one salinity (25 ppt) only.

In the zoea I stage, NKA immunostaining was observed along the inner epithelium of the branchiostegite (Fig. 4a, b), without significant differences in fluorescence intensity between populations (see also below).

In the zoea V stage, the immunolocalization of NKA in the branchial chamber showed differences between populations. In population A, strong immunostaining occurred along the inner epithelium of the branchiostegite, whereas the gill buds showed only a faint immunostaining (Fig. 4c). In population P, a reverse situation was observed: immunostaining was pronounced in the gill lamellae (Fig. 4e), whereas only weak traces were noted in the inner epithelium of the branchiostegite (Fig. 4d). The epithelial cells of the epipodite buds were immunostained (Fig. 4f) with no visible difference between populations (not shown).

In decapodids of population A, a significantly stronger immunostaining intensity was observed and measured in the cells lining the inner epithelium of the branchiostegite as compared with both the zoea V stage and the decapodid stage of population P (Fig. 4g, h; see also below). The gill lamellae were more developed in population A but still presenting faint immunostaining (Fig. 4g). By comparison,

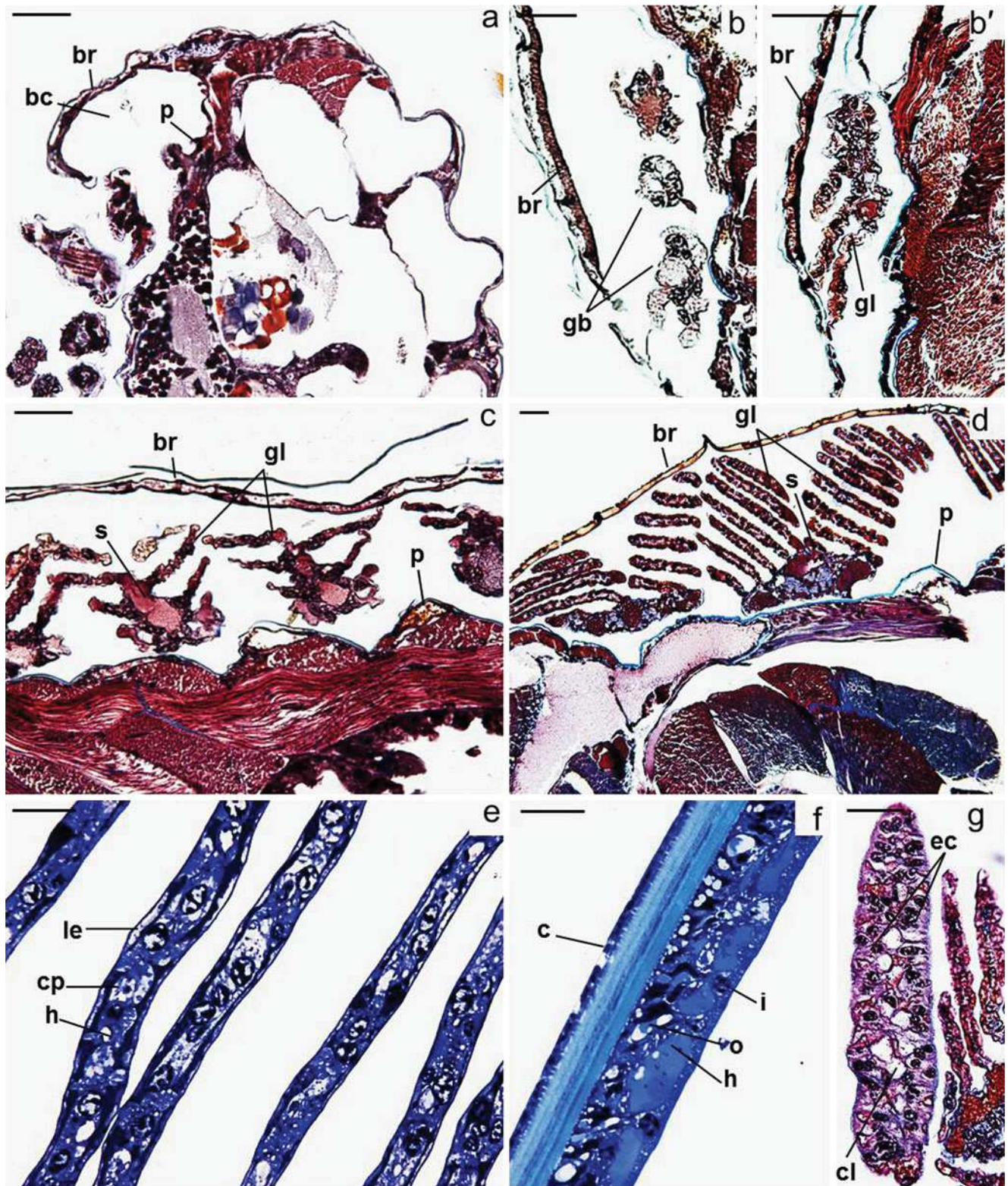
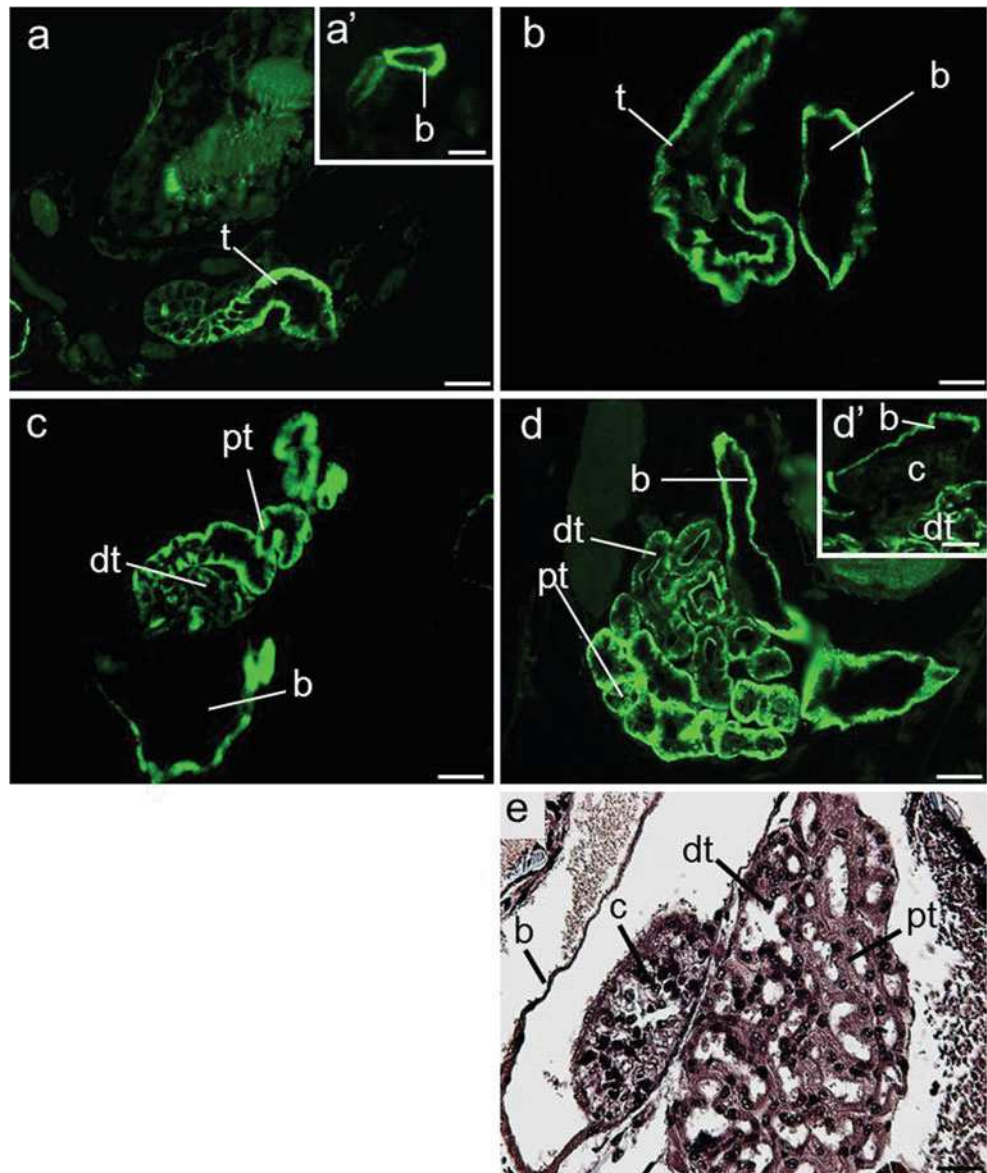


Fig. 2 Development of the branchial chamber during ontogeny; transverse sections. **a–g** Amazon population. **b'** Pantanal population. **a** Absence of gills in the zoea I stage (*bc* branchial chamber, *br* branchiostegite, *p* pleura). **b** Gill buds (*gb*) in the zoea V stage. **b'** Gill lamellae (*gl*) in the zoea V stage. **c** Development of gill lamellae in the

decapodid stage (*s* shaft). **d** Gills of a juvenile. **e** Semi-thin section of gill lamellae of a juvenile (*cp* central part, *le* lateral expansions, *h* hemolymph lacuna). **f** Semi-thin section of branchiostegite of a juvenile (*c* cuticle, *i* inner epithelium, *o* outer epithelium). **g** Epipodite from the juvenile stage (*cl* central lacuna, *ec* epithelial cells). Bars 40 μ m

Fig. 3 Ontogeny of the antennal glands in the Pantanal population maintained in moderately diluted seawater (25 ppt). **a, a'** Zoea I stage (*b* bladder, *t* tubules). **b** Zoea V stage. **c** Decapodid stage (*dt* distal tubules, *pt* proximal tubules). **d, d', e** Juveniles (*c* coelomosac). Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase (**a–d, d'**) and Masson trichrome staining (**e**). Bars 20 μm



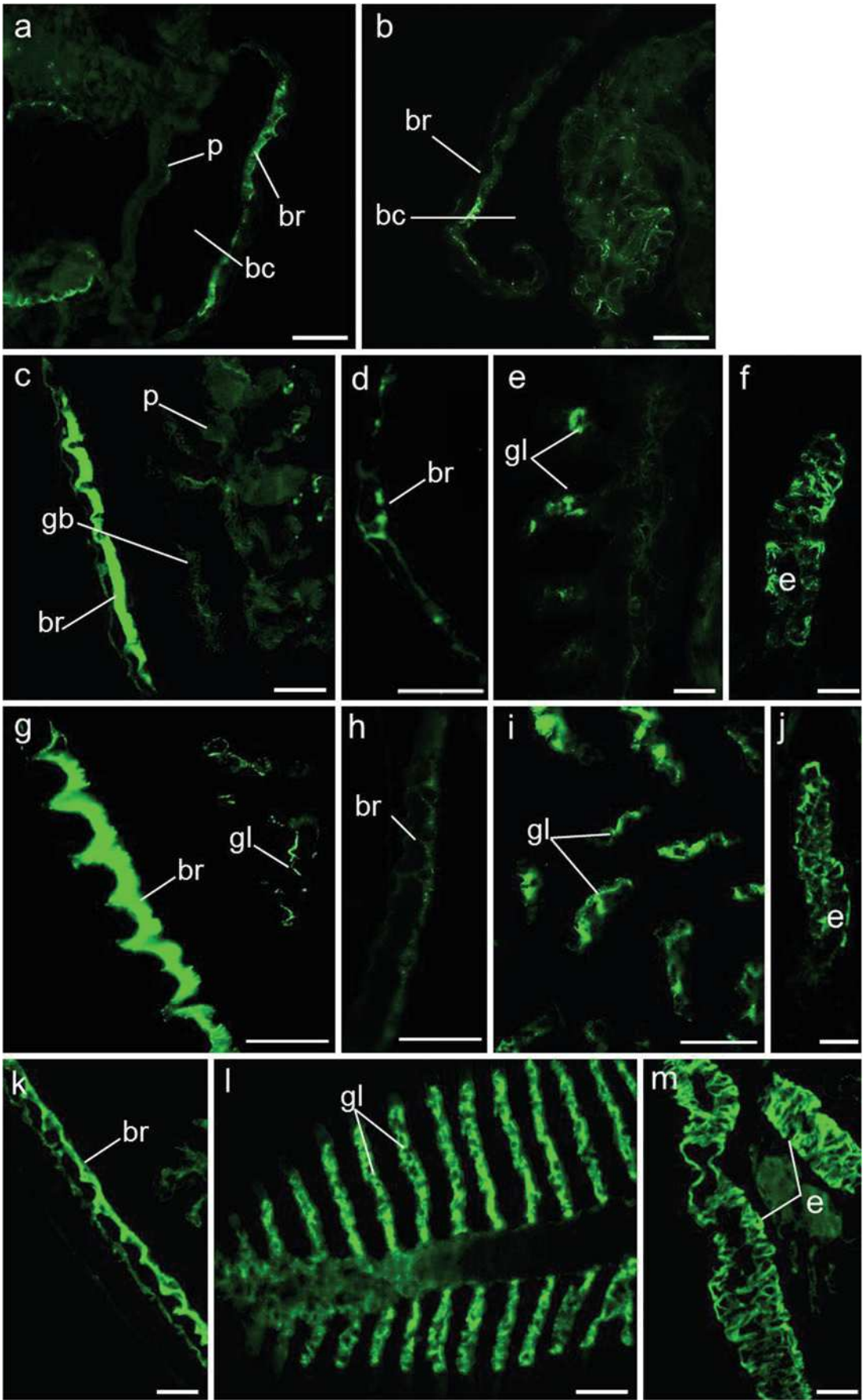
in population P, the gill lamellae of the decapodids exhibited strong immunostaining (Fig. 4i). The epithelial cells of the epipodites were immunostained (Fig. 4j) with no conspicuous differences between populations (not shown).

In early juveniles, the inner epithelium of the branchiostegite was strongly immunostained (Fig. 4k), without showing significant intensity differences between populations (see below). The central part of the gill lamellae and the two facing epithelia of the epipodites were immunostained (Fig. 4l, m) without differences between populations (not shown).

In late juveniles, no differences between populations or salinities were observed in the immunostaining of the gills and epipodites (not shown). For the branchiostegite in population A, a difference in the immunostaining intensity was observed between salinities (Fig. 5a, b; see also below): the immunofluorescence in the inner epithelium was significantly stronger at salinity 25 ppt

than at 0.2 ppt. In population P, all shrimp died at 25 ppt.

Fig. 4 Immunolocalization of Na^+/K^+ ATPase ontogeny in the branchial chamber from the Amazon (**a, c, g, k, l, m**) and the Pantanal (**b, d, e, f, h, i, j**) populations maintained at 25 ppt (longitudinal sections). **a, b** Branchial chamber (*bc*) of the zoea I stage (*p* pleura). Immunostaining along the inner epithelium of the branchiostegite (*br*). **c** Branchial chamber of the zoea V stage. Immunostaining in the branchiostegite but not in gill buds (*gb*). **d** Gill lamellae from the zoea V stage showing immunostaining. **e** Branchiostegite of the zoea V stage with slight immunostaining (*gl* gill lamellae). **f** Immunostained epipodite bud at the zoea V stage (*e* epipodite). **g** Branchial chamber of the decapodid stage. Immunostaining in the branchiostegite but not in gill lamellae. **h** Branchiostegite of the decapodid stage with low immunostaining. **i** Gill lamellae from the decapodid stage with high immunostaining. **j** Immunostained epipodites at the decapodid stage. **k** Branchiostegite with immunostaining in the inner epithelium at the early juvenile stage. **l** Gill lamellae with high immunostaining in the central zone at the early juvenile stage. **m** Immunostained epipodites at the early juvenile stage. Bars 40 μm



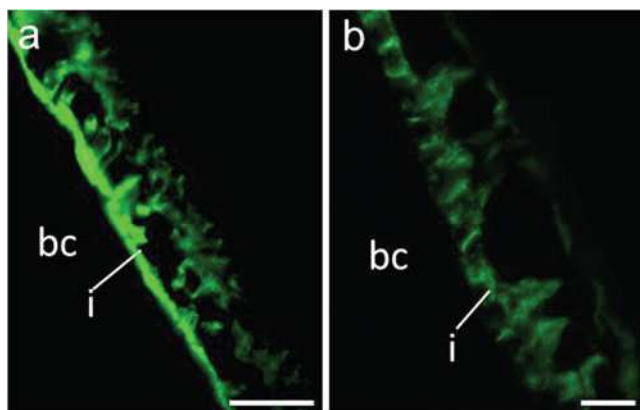
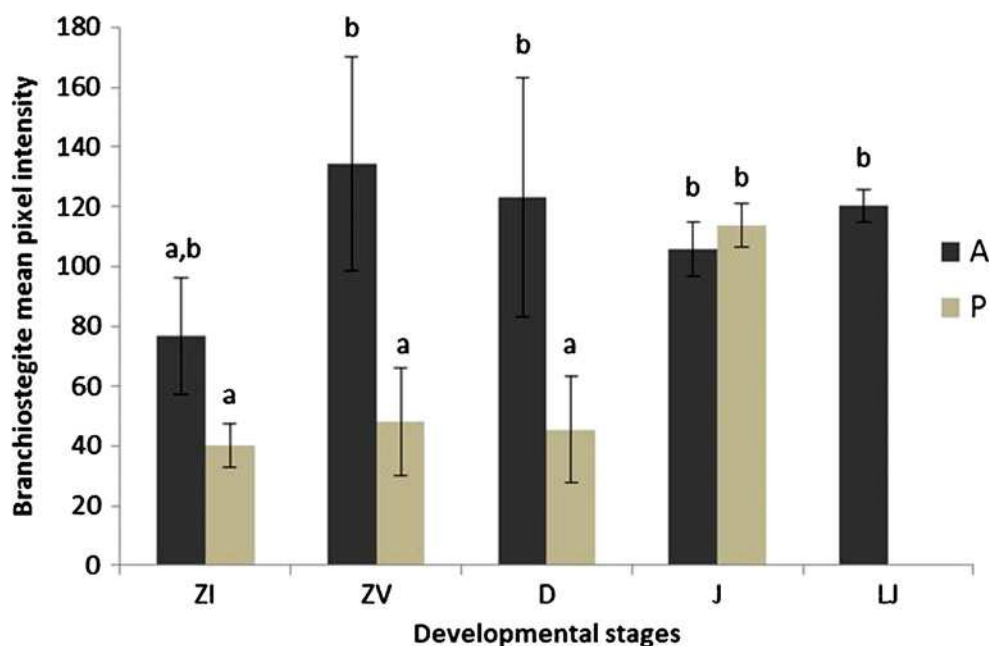


Fig. 5 Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in late juveniles from the Amazon population. **a** Branchiostegite from juveniles kept at 25 ppt (*bc* branchial chamber); note the high immunostaining in the inner epithelium (*i*). **b** Branchiostegite from juveniles kept in freshwater (0.2 ppt); note only slight immunostaining. Bars 40 μm

Antennal glands In the zoea I and V stages, NKA was expressed in the basal part of the tubule and the bladder, with no visible differences between populations or salinities (Fig. 3a, a', b). At the zoea V stage, no immunostaining was observed in the coelomosac. In decapodids, the basal side of the distal tubule showed only weak immunostaining, which was stronger in the cells of the proximal tubule (Fig. 3c). The basal side of the bladder cells was evenly immunostained (Fig. 3c). In juveniles, NKA was localized in all three regions of the antennal gland (proximal and distal tubules and bladder; Fig. 3d), whereas no immunostaining was detected in the coelomosac (Fig. 3d').

Fig. 6 Mean pixel intensity after immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the branchiostegite from the Amazon (*A*) and Pantanal (*P*) populations at various developmental stages (ZI zoea I, ZV zoea V, D decapodid, J juvenile, LJ late juvenile) kept at 25 ppt. Individuals from the late juvenile stage of the Pantanal population exposed to 25 ppt died. Data are expressed as means \pm SD ($n=3$ animals). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)



Quantitative analysis

In the zoea I stage, the NKA immunostaining observed along the inner epithelium of the branchiostegite (Fig. 4a, b) showed no significant differences in fluorescence intensity between populations (Fig. 6). In decapodids of population A, the immunostaining intensity was significantly stronger when measured in the cells lining the inner epithelium of the branchiostegite as compared with both the zoea V stage and the decapodid stage of population P (Figs. 4g, h, 6). In early juveniles, although the inner epithelium of the branchiostegite was strongly immunostained (Fig. 4k), no significant intensity differences were detected between populations (Fig. 6). In late juveniles, as mentioned above, the immunostaining of the gills and epipodites exhibited no differences between populations or salinities (not shown). A difference in the immunostaining intensity was observed and measured between salinities with regard to branchiostegites of population A (Figs. 5a, b, 7), immunofluorescence in the inner epithelium being significantly stronger at salinity 25 ppt than at 0.2 ppt. In FW, the branchiostegite of population P presented a weaker fluorescence intensity compared with that observed in population A (Fig. 7).

Discussion

Osmoregulatory structures

M. amazonicum possess phyllobranchiate gills, as do all caridean shrimps and brachyuran crabs (Péqueux 1995). During ontogeny, gill development progresses at various speeds in the A and P populations. Typically, estuarine

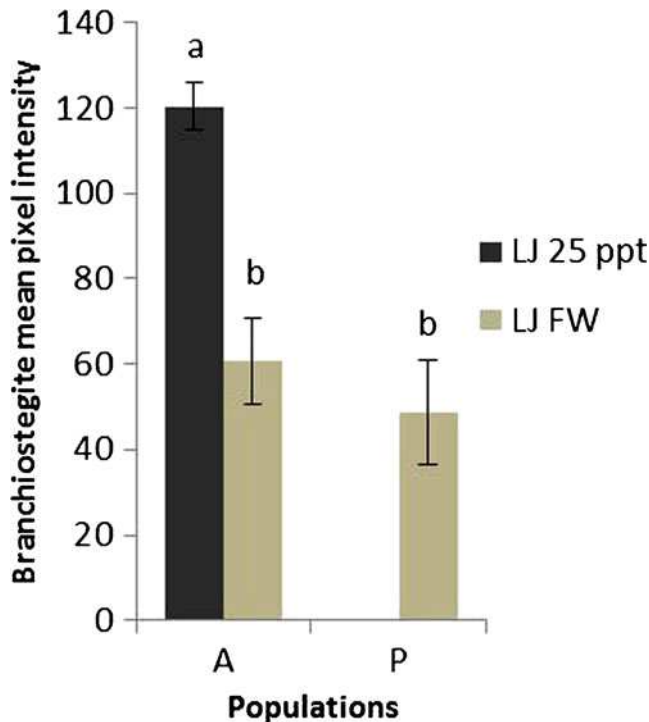


Fig. 7 Mean pixel intensity after immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the branchiostegite of late juveniles (LJ) from the Amazon (A) and Pantanal (P) populations exposed to 25 ppt and freshwater (FW; 0.2 ppt). Individuals from the Pantanal population exposed to 25 ppt died. Data are expressed as mean \pm SD ($n=3$ animals). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

species of *Macrobrachium* possess an extended larval development with eight or more stages before they reach the juvenile stage, whereas most fully limnic species show an abbreviated development with three or fewer stages (Anger 2001). As a consequence of the different modes of development in the different species, newly hatched larvae can express morphological structures in an advanced state. The various populations of *M. amazonicum*, however, represent an exception from the rule of abbreviated development in FW, as they pass consistently through an extended development, regardless of an estuarine or hololimnic life style (Charmantier and Anger 2011). Compared with the larvae of population A, those of population P show an accelerated gill development, which might be an adaptation to their development in dilute media.

In the larval stages of both populations, the gill epithelium appear undifferentiated, similar to previous observations in the marine shrimp, *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005) and in the crab, *Carcinus maenas* (Cieluch et al. 2004). The epithelium begins to differentiate only in the juvenile phase, with a complete branchial formula, each gill with an axial zone and lateral expansions forming thin sheets along the inner surface of the thin cuticle. This organization has

previously also been described for *M. amazonicum* (Faleiros et al. 2010) and is comparable to that found in *M. olfersii* (McNmara and Lima 1997) and other caridean shrimps (Martinez et al. 2005; Freire et al. 2008). Earlier studies of caridean and palaemonid shrimps indicate the coexistence of two zones in the gills: a thin zone that is supposedly involved in gas exchange and a differentiated axial zone involved in active ion exchange (Cieluch et al. 2005; Martinez et al. 2005). This has been supported by ultracytological studies showing that the axial zone of the epithelial cells of the gill lamellae of *M. amazonicum* possess a network of basal internal membranes that are closely associated with numerous mitochondria (Belli et al. 2009; Faleiros et al. 2010).

Immunolocalization of NKA

Gills and branchiostegites The occurrence of osmoregulation in larval stages is based on ionic regulation achieved by specialized transporting cells on which the enzyme NKA is abundantly located (Lignot et al. 1999; Lignot and Charmantier 2001; Lucu and Towle 2003; Cieluch et al. 2004; Charmantier et al. 2009). NKA is the major driving force for active ion exchange in crustacean gills (Lucu 1990; Péqueux 1995; Lucu and Towle 2003) within which it has been immunocytochemically localized in the basolateral membranes of ionocytes in osmoregulatory tissues (Towle and Kays 1986; Ziegler 1997; Lignot and Charmantier 2001). In some species, e.g., the crab *Carcinus maenas* (Cieluch et al. 2004) or the shrimp *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005), the ontogeny of osmoregulatory capacity and salinity tolerance are closely correlated with the development of ionocytes and with the expression of NKA in organs of the branchial chamber.

In the present study, we have found that, in the zoea I of two populations (A, P) of *M. amazonicum* exposed to two salinities (5 ppt, 25 ppt), the inner epithelium of the branchiostegite shows consistently a positive immunoreactivity for NKA. This epithelium also shows, in other crustaceans, typical features of ionocytes, such as apical microvilli and basolateral infoldings of the cytoplasmic membrane, which are in close contact with numerous mitochondria (Cieluch et al. 2004). A similar type of differentiation has been observed in the penaeid shrimp, *Farfantepenaeus aztecus* (Talbot et al. 1972) and in the thalassinid shrimp, *Callinassa jamaicensis* (Felder et al. 1986). The presence of NKA in the branchiostegite and the typical ultrastructure of ion-transporting epithelia indicate that these structures are involved in the process of active ion exchange, being expressed as early as hatching. Similar findings have also been reported for *Penaeus japonicus* (Bouaricha et al. 1994) and *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005).

In the zoea V and decapodid stages, we have observed significant differences between populations A and P. In population A, NKA immunoreactivity is weak in the gills, suggesting a limited function of this organ in active ion exchanges. The branchiostegite, however, displays a more intense immunostaining suggesting participation in ion transport. The opposite pattern has been observed in population P in which immunofluorescence of NKA is strong in the gills but weak in the branchiostegites. Thus, we hypothesize that the strong hypo-osmoregulatory capacity of these early developmental stages in population A (Charmantier and Anger 2011) is linked to ion transport in the branchiostegites, whereas the gill lamellae are not fully developed. The inability of population P to effectively hypo-osmoregulate (Charmantier and Anger 2011) might thus be attributable to the weakness or absence of an ion-transporting epithelium along the inner side of the branchiostegite. At low salinities, the presence of fully functional gills expressing NKA seems to be essential in late developmental stages for successful FW adaptation and colonization.

In juveniles, we have detected no difference between the two populations. Gill lamellae are well developed and possess differentiated epithelia with a positive immunoreactivity indicating the presence of NKA in the central epithelial zone. Faleiros et al. (2010) have reported that this zone shows, in *M. amazonicum*, the typical ultrastructural features of ionocytes. In combination with our results, this suggests, as in other species, a participation of the branchial cells in osmoregulation (Lignot et al. 1999; Lignot and Charmantier 2001). In contrast to the brachyuran crab (Péqueux 1995; Lucu and Towle 2003; Cieluch et al. 2007), no functional differentiation between ion-regulating posterior gills and respiratory anterior gills occurs in the caridean shrimp. Instead, we have found a functional differentiation within each gill. As previously described for *M. amazonicum* (Faleiros et al. 2010; Belli et al. 2009) and for other caridean species such as *Palaemon adspersus* (Martinez et al. 2005) and *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005), two types of epithelia coexist in a single gill lamella: thin areas of epithelium involved in gas exchange and axial zones specialized in ion transport. To answer the question of whether these two different areas and functions coexist in the same cell, as in the branchial cells of *Palaemon adspersus* (Martinez et al. 2005), ultrastructural investigations will be necessary. The inner epithelium of the branchiostegites of early juveniles is also immunostained, with no differences between populations or salinities. The presence of this enzyme in the branchiostegites has also previously been reported for juvenile *Homarus gammarus* (Lignot et al. 1999; Lignot and Charmantier 2001), *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005) and *Penaeus japonicus*, indicating that branchiostegites serve as the main

osmoregulatory organ during the larval and early juvenile phases (Bouaricha et al. 1994). In juveniles, no difference has been detected between populations, which might be related to the similar life styles of juvenile and adult shrimp in FW environments.

In late juveniles, no difference has been observed in gill immunostaining between populations or salinities. In the inner epithelium of the branchiostegites of population A, however, a different immunostaining intensity occurs at different salt concentrations. At a salinity of 25 ppt, immunostaining intensity is stronger than in FW, suggesting that the branchiostegites in this population are involved in hypo-osmoregulation at high salinities and that the inner epithelium of the branchiostegite has a secretory function. With regard to population P, we have been unable to obtain corresponding data, because the shrimp do not survive at salinity 25 ppt, probably because they cannot excrete enough ions. In FW, the branchiostegites are also weakly immunostained, as in population A, suggesting that the branchiostegites in late juveniles are less involved in hyper-osmoregulation.

Epipodites Strong fluorescent staining has demonstrated the presence of NKA in the epipodites of all studied stages, except for the zoea I stage in which these structures are still absent. These observations indicate an early appearance of the capability of active ion transport during larval development, confirming the role of these organs in osmoregulation (Haond et al. 1998; Lignot et al. 1999). In most crustaceans, epipodites and gills appear only in late larval stages in which they seem to have an osmoregulatory function (Bouaricha et al. 1994), as indicated by the large numbers of ionocytes and high levels of NKA, for instance, in *Palaemon adspersus* (Martinez et al. 2005), *Homarus americanus* and *Astacus leptodactylus* (Lignot et al. 2005). However, in *M. amazonicum*, the relatively small size of these structures compared with those of other decapod species suggests a limited role in this species.

Antennal glands The antennal glands of *M. amazonicum* develop progressively. In the zoea I and V stages, NKA has been detected in the tubule and the bladder. This suggests an early setup of ion reabsorption. However, the question of the functionality of the excretory antennal glands in early life-history stages remains open (Anger 2001). At the decapodid stage, the tubule begins to differentiate into two distinct parts, the proximal and distal tubules. This differentiation coincides with the migratory pattern of population A, which includes an upstream migration of late larvae or early juveniles into riverine habitats, where the antennal glands may have an increasingly important role for ion reabsorption. In juvenile shrimp, NKA has been detected in diverse parts of the antennal glands, the bladder and tubule, with no

variation between populations or salinities. Strong immunostaining has been observed in the proximal part of the tubule. These results are in accordance with the ultrastructure of the epithelial cells of the tubules and the bladder present in other decapod crustacean species, showing typical features of ionocytes (Khodabandeh et al. 2005a, 2005b). These structures might allow for the formation of dilute urine. Khodabandeh et al. (2005b) have also shown that the maximum concentration of NKA lies in the proximal tubules of the antennal glands of crayfish, *Astacus leptodactylus* and lobster, *Homarus gammarus*. The proximal tubule might thus be the primary site of ion reabsorption in the antennal gland (Charmantier et al. 2009). However, high levels of NKA might also indicate the involvement of the tubule in non-osmoregulatory transport functions such as sugar and amino acid reabsorption or organic acid secretion into the urine (Vogt 2002). The distal tubule exhibits low immunostaining compared with that of the proximal tubule. Ultrastructural studies conducted on other decapod crustaceans suggest that the distal tubule region is more active in secretory than reabsorption functions (Peterson and Loizzi 1974; Fuller et al. 1989; Khodabandeh et al. 2005a). The bladder cells present morphological similarities with the cells of the proximal tubule suggesting functional analogies between these two sites (Khodabandeh et al. 2005a, 2005b). As NKA is highly concentrated in bladder cells, a last modification of the filtrate might occur here before the release of urine. No NKA has been detected in the coelomosac, regardless of the population or salinity. This corresponds to the function of hemolymph ultrafiltration implied by the ultrastructure of the coelomosac podocytic cells described in *Astacus leptodactylus* and *Homarus gammarus* (Khodabandeh et al. 2005a, 2005b). Finally, no difference in the intensity of immunostaining of the various parts of the gland has been detected between salinities (5 ppt vs 25 ppt), suggesting a difference in enzyme activities. This has been found in the antennal glands of crab, *Ucides cordatus*, in which NKA activity decreases significantly in salinity, 26 compared with 9 (Harris and Santos 1993). This finding is consistent with the notion that NKA drives sodium and chloride reabsorption, leading to the production of dilute urine, as in the crayfish or other species living in FW (Mantel and Farmer 1983; Charmantier et al. 2009).

Concluding remarks

In summary, osmoregulatory structures develop progressively during the postembryonic development of *M. amazonicum*. In the zoea I stage, i.e., before gills and epipodites are present, typical features of osmoregulatory epithelia have been observed in the branchiostegite and antennal glands in both the studied populations. In the zoea V and decapodid stages, with regard to the branchial

chamber, the branchiostegite appears as the main osmoregulatory organ in population A and the gills in population P. This difference might be related to the different capabilities for osmoregulation and reproductive migration in the two populations (Anger and Hayd 2010; Charmantier and Anger 2011). Under natural conditions, the larval stages of population A develop in estuarine habitats with salinity fluctuations, whereas those of population P live in FW of landlocked limnic habitats. In addition, the antennal glands and the epipodites buds also seem to contribute to osmoregulation in both the populations. In juveniles of both populations, all of the above organs contribute to osmoregulation in FW. In conclusion, the ontogeny of osmoregulatory structures described in this study is strongly correlated with the ontogeny of the physiological processes of osmoregulation and both are correlated with the ecology of *M. amazonicum*.

Acknowledgments The authors are grateful to Dr. Liliam Hayd, State University of Mato Grosso do Sul, Aquadauana, Brazil, for transporting live shrimp from Brazil to Helgoland, to IBAMA (Brasília) for the permit to export shrimps, to Uwe Nettelmann for help in maintaining shrimp cultures and to Maryline Bossus for her advice.

References

- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean issues 14. Balkema, Lisse
- Anger K (2013) Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. J Crust Biol (in press)
- Anger K, Hayd L (2010) Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. Aquatic Biol 9:251–261
- Anger K, Hayd L, Knott J, Nettelmann U (2009) Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture 287:341–348
- Augusto A, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC (2007) The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater Palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. offersi* (Decapoda). J Crust Biol 27:626–634
- Augusto A, Pinheiro AS, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC (2009) Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. Aquatic Biol 7:113–122
- Bauer R (2004) Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the Carideans. University of Oklahoma Press, Norman
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KCS, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM (2009) Na⁺/K⁺-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). Comp Biochem Physiol A 152:431–439
- Bouaricha N, Charmantier-Daures M, Thuet P, Trilles J-P, Charmantier G (1994) Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Biol Bull 186:29–40
- Charmantier G, Anger K (2011) Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss

- of hypo-osmoregulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *J Exp Marine Biol Ecol* 396:89–98
- Charmantier G, Charmantier-Daures M, Towle DW (2009) Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: Evans DH (ed) *Osmotic and ionic regulation: cells and animals*. Taylor & Francis Group, London, pp 165–208
- Cieluch U, Anger K, Aujoulat F, Buchholz F, Charmantier-Daures M, Charmantier G (2004) Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Biol* 207:325–336
- Cieluch U, Charmantier G, Grousset E, Charmantier-Daures M, Anger K (2005) Osmoregulation, immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiol Biochem Zool* 78:1017–1025
- Cieluch U, Anger K, Charmantier-Daures M, Charmantier G (2007) Osmoregulation and immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase during the ontogeny of the mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea). *Mar Ecol Progr Ser* 329:169–178
- Faleiros RO, Goldman MHS, Furriel RPM, McNamara JC (2010) Differential adjustment in gill Na^+/K^+ - and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J Expl Biol* 213:3894–3905
- Felder J, Felder D, Hand S (1986) Ontogeny of osmoregulation in the estuarine ghost shrimp *Callinassa jamaicensis* var *louisianensis* Schmitt (Decapoda, Thalassinidae). *J Exp Mar Biol* 99:91–105
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC (2003) Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp Biochem Physiol A* 136:771–778
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol A* 151:272–304
- Fuller EG, Highison GJ, Brown F, Bayer C (1989) Ultrastructure of the crayfish antennal gland revealed by scanning and transmission electron microscopy combined with ultrasonic microdissection. *J Morphol* 200:9–15
- Haond C, Flik G, Charmantier G (1998) Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. *J Exp Biol* 201:1817–1833
- Harris RR, Santos MCF (1993) Ionoregulatory and urinary responses to emersion in the mangrove crab *Ucides cordatus* and the intertidal crab *Carcinus maenas*. *J Comp Physiol B* 163:18–27
- Hayd L, Anger K (2013) Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Revista Biol Trop (Int J Trop Biol)* 61:39–57
- Khodabandeh S, Charmantier G, Blasco C, Grousset E, Charmantier-Daures M (2005a) Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. *Cell Tissue Res* 319:153–165
- Khodabandeh S, Kutnik M, Aujoulat F, Charmantier G, Charmantier-Daures M (2005b) Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase. *Cell Tissue Res* 319:167–174
- Lee CE, Bell MA (1999) Invasion of fresh waters by saltwater animals. *Trends Ecol Evol* 14:449
- Lignot J-H, Charmantier G (2001) Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *J Histochem Cytochem* 49:1013–1023
- Lignot J-H, Charmantier-Daures M, Charmantier G (1999) Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* 296:417–426
- Lignot J-H, Susanto GN, Charmantier-Daures M, Charmantier G (2005) Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* 319:331–339
- Lucu C (1990) Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp Biochem Physiol* 97:297–306
- Lucu C, Towle DW (2003) Na^+/K^+ -ATPase in gills of aquatic crustacean. *Comp Biochem Physiol A* 135:195–214
- Maciel CR, Valenti WC (2009) Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius* 17:61–79
- Magalhães C (1985) The larval development of palaemonids from Amazon region reared in the laboratory. I. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). *Amazoniana* 9:247–274
- Magalhães C, Walker I (1988) Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). *Crustaceana* 55:279–292
- Mantel LH, Farmer LL (1983) Osmotic and ionic regulation. In: Mantel LH (ed) *The biology of Crustacea*. Academic Press, New York, pp 53–161
- Martinez AS, Charmantier G, Compère P, Charmantier-Daures M (2005) Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue Cell* 37:153–165
- McNamara JC, Lima AG (1997) The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biol Bull* 192:321–331
- Odinetz Collart O (1991) Stratégie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Crustaceana* 61:253–270
- Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *J Crust Biol* 15:536–536
- Peterson DR, Loizzi RF (1974) Ultrastructure of the crayfish kidney, coelomosac, labyrinth, and nephridial canal. *J Morphol* 142:241–264
- Talbot P, Clark WH, Lawrence AL (1972) Ultrastructural observations of muscle insertion and modified branchiostegite epidermis in larval brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Tissue Cell* 4:613–628
- Towle DW, Kays WT (1986) Basolateral localization of Na^+/K^+ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J Exp Zool* 239:311–318
- Vergamini FG, Pileggi LG, Mantelatto FL (2011) Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contrib Zool* 80:67–83
- Vogt G (2002) Functional anatomy. In: Holdich DM (ed) *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, pp 53–151
- Ziegler A (1997) Immunocytochemical localization of Na^+/K^+ -ATPase in the calcium-transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L (Crustacea). *J Histochem Cytochem* 45:437–446

CHAPITRE IV.

**Ultrastructure des organes de la cavité branchiale de
M. amazonicum et distribution cellulaire de la
 Na^+/K^+ ATPase et de la V-type H^+ ATPase**

Chapitre IV : Ultrastructure des organes de la cavité branchiale de *M. amazonicum* et distribution cellulaire de la Na^+/K^+ ATPase et de la V-type H^+ ATPase

1. Travaux antérieurs:

La régulation osmotique et ionique chez les crustacés est principalement réalisée par les branchies, avec une participation des branchiostégites, des épipodites et des organes excréteurs (glandes antennaires). En plus de leur rôle dans les échanges gazeux, les branchies constituent l'organe principal des transports actifs d'ions, un rôle d'une importance majeure qui sous-tend de nombreuses fonctions physiologiques essentielles comme l'osmorégulation, la régulation du calcium, l'excrétion de l'ammonium et la régulation du pH extracellulaire (Freire et al., 2008). Les branchies de nombreux crabes brachyours sont en général structurellement différenciées en deux parties distinctes, les branchies antérieures principalement responsables des échanges gazeux et les branchies postérieures impliquées dans les transports ioniques (Barra et al., 1983; Gilles et Péqueux, 1985; Compère et al., 1989; Péqueux, 1995). Toutefois, les branchies des crevettes palaemonidae comme par exemple celles de la crevette d'eau douce *Macrobrachium olfersii* (McNamara, 1987) sont plus uniformes et un seul type de branchie effectue les deux fonctions (respiration et osmorégulation), une capacité liée à l'organisation structurelle des cellules épithéliales de ces branchies (Freire et McNamara, 1995). Les lamelles branchiales sont constituées d'une part d'une couche continue de cellules épithéliales situées au centre de la lamelle qu'on appelle les cellules septales. Chez *M. olfersii* (McNamara et Lima, 1997), ces cellules présentent une ultrastructure typique des ionocytes à savoir la présence de longues invaginations de la membrane cytoplasmique occupant la majeure partie de la cellule en association étroite avec des mitochondries. Des cellules d'un autre type entrent dans la constitution des lamelles branchiales, ce sont les cellules piliers. La surface apicale des cellules piliers est augmentée par des replis de la membrane sous forme de microvillosités (Copeland, 1968; Copeland et Fitzjarrell, 1968; Gilles et Péqueux, 1985; Maina, 1990). Ces cellules présentent également des expansions latérales qui s'étendent sous une fine cuticule. Les échanges gazeux sont censés se produire dans cette zone (McNamara et Lima, 1997).

Pour expliquer les voies d'absorption et de sécrétion des ions chez les crustacés, plusieurs modèles de mécanismes d'osmorégulation ont été proposés (Towle et Weihrauch, 2001; Weihrauch et al., 2001; Freire et al., 2008; Charmantier et al., 2009; McNamara et al., 2012).

La caractérisation et la localisation des transporteurs et canaux ioniques devraient conduire à l'élaboration de modèles d'ionocytes fonctionnels et ainsi participer à une meilleure compréhension des mécanismes d'osmorégulation en situation d'hyper- et d'hypo-osmorégulation. Il est largement admis que l'absorption de Na^+ est principalement assurée par la NKA située chez certaines crevettes au niveau des invaginations membranaires des cellules septales (Lima et al., 1997 ; Onken et Ristenpatt, 1998; Furriel et al., 2000; McNamara et Faria, 2012). De plus, des travaux sur plusieurs groupes d'organismes (crustacés, poissons, insectes) suggèrent que la pompe à protons V-type H^+ ATPase (VHA), qui est une protéine impliquée dans la régulation acido-basique de la cellule, peut également être impliquée dans les transports ioniques en complément de l'action de la NKA. Son rôle a surtout été montré en eau douce. En position apicale, elle transporte des protons de la cellule vers le milieu externe, créant un gradient électrique qui permet l'absorption d'ions *via* des canaux spécifiques (Piermarini et Evans, 2001; Kirschner, 2004 ; Beyenbach et Wieczorek, 2006 ; Tsai et Lin, 2007; Huang et al., 2010; Lee et al., 2011). Dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, la VHA en position apicale semble être impliquée dans l'absorption du Cl^- . Ceci a été démontré par électrophysiologie sur des branchies isolées et perfusées, où une diminution significative de l'entrée de Cl^- a été observée après l'application externe de la bafilomycine, un inhibiteur de la VHA (Onken et Putzenlechner, 1995; Riestenpatt et al., 1995). En outre, la VHA en position apicale pourrait, comme dans la peau de grenouille (Ehrenfeld et al., 1990; Harvey, 1992) ou chez plusieurs espèces de poissons (Wilson et al., 2000) participer à l'absorption du Na^+ (Kirschner, 2004). Bien que la localisation subcellulaire de la VHA soit encore peu explorée dans les branchies des crustacés, l'hypothèse de l'implication de cette pompe dans l'osmorégulation en eau douce a été renforcée par des études sur l'expression de gènes et les activités enzymatiques (Faleiros et al., 2010; Lee et al., 2011; Towle et al., 2011). Chez *M. amazonicum*, le taux des ARNm de la sous-unité B de la VHA diminue de façon significative après une acclimatation à une salinité de 21 ppt (Faleiros et al., 2010). L'activité enzymatique de la VHA diminue également et devient négligeable après une période d'acclimatation de 10 jours à 21 ppt (Faleiros et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés chez d'autres espèces de crustacés notamment chez le crabe d'eau douce *Dilocarcinus pagei* (Weihrauch, 2004; Firmino et al., 2011), chez une espèce intertidale de crabe, *Uca formosensis* (Tsai et Lin, 2007), et chez le copépode *Eurytemora affinis* (Lee et al., 2011).

2. Résultats personnels:

L'article correspondant (Article 2): "Differential distribution of V-type H^+ ATPase and Na^+/K^+ ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*" est joint à la fin de ce paragraphe.

Ce travail a été consacré pour une part à déterminer l'ultrastructure des organes osmorégulateurs de la cavité branchiale (branchies et branchiostégites) à différentes salinités. De plus, nous avons étudié la caractérisation et la localisation de la pompe à protons V-type H^+ ATPase (VHA), et de la NKA au niveau des branchies et des branchiostégites.

Ultrastructure de la cavité branchiale et effet de la salinité

Tous les résultats d'ultrastructure ont été obtenus pour *M. amazonicum*, puisque des observations sur *M. pantanalense* nous ont permis de conclure qu'il n'y a pas de différence d'ultrastructure entre les deux espèces.

1-Branchies

Les lamelles branchiales sont constituées exclusivement de deux types de cellules, les cellules septales et les cellules piliers. L'hémolymph circule entre les deux types de cellules dans des lacunes symétriques des deux côtés de la lamelle (Fig. 6).

Les cellules septales forment une zone épaisse au centre de la lamelle branchiale. Ces cellules présentent une ultrastructure typique des ionocytes : la surface de leur membrane est fortement amplifiée par de profondes et nombreuses invaginations en association étroite avec de nombreuses mitochondries.

Les cellules piliers sont réparties symétriquement de part et d'autre des cellules septales. Ces cellules forment des piliers qui sont en contact basolatéralement à la fois avec les cellules septales et l'hémolymph. Elles émettent aussi des expansions latérales sous une fine cuticule au contact du milieu extérieur.

En eau douce, la surface apicale des cellules piliers est fortement amplifiée par un système de microvillosités associées à des mitochondries et à de petites vésicules. Ce système se trouve principalement au-dessus du noyau ; il est plus limité dans les expansions latérales. La surface basale des cellules piliers n'est pas invaginée ou associée à des mitochondries.

L'acclimatation à 25 ppt pendant 2 semaines induit diverses modifications ultrastructurales dans les branchies de *M. amazonicum*. Ces changements comprennent la réduction de l'épaisseur des expansions latérales des cellules piliers par rapport à celles en eau douce. La profondeur et le nombre des microvillosités apicales sont également réduits tandis que la taille des lacunes hémolymphatiques est plus importante.

2-Branchiostégites

Le branchiostégite est un repli latéro-dorsal qui limite extérieurement la cavité branchiale et est en contact avec le milieu extérieur sur ses deux faces, en particulier du côté interne, c'est-à-dire vers la chambre branchiale. Il comprend deux épithéliums, externe et interne, séparés par des lacunes hémolymphatiques. Les deux épithéliums sont liés par des cellules piliers. L'épithélium externe, sous une épaisse cuticule, est légèrement différencié et son épaisseur varie selon le stade de mue. L'épithélium interne semble avoir des caractéristiques ultrastructurales typiques d'un épithélium transporteur d'ions, avec des microvillosités apicales (sous une fine cuticule en contact avec l'eau remplissant la cavité branchiale) et une membrane basale (au contact de l'hémolymphe) formée de nombreuses invaginations profondes atteignant le côté apical des cellules en association avec d'abondantes mitochondries. Comme au niveau des branchies, l'acclimatation à 25 ppt induit des modifications ultrastructurales de l'épithélium interne des branchiostégites. Les microvillosités apicales sont totalement absentes par rapport à la structure en eau douce. Les invaginations basales semblent être moins denses et moins profondes.

En conclusion, l'organisation et la structuration des branchies en cellules septales et cellules piliers, qui présentent des caractéristiques d'ionocytes, suggèrent l'implication des deux types de cellules dans le transport transépithélial. Les changements observés suite à un transfert dans un milieu salé sont similaires au niveau des lamelles branchiales et de l'épithélium interne du branchiostégite. La présence de microvillosités apicales semble être une adaptation aux faibles salinités permettant une absorption efficace d'ions. En eau salée, au contraire, l'animal réduit sa surface d'échange avec le milieu externe et diminuerait ainsi l'invasion passive d'ions.

Localisation de la VHA et de la NKA au niveau de la cavité branchiale; influence de la salinité

Aucune différence d'immunomarquage de la VHA n'a été observée entre espèces (*M. amazonicum* et *M. pantanalense*).

1-Branchies

La VHA a été localisée par immunofluorescence chez les juvéniles de *M. amazonicum* au niveau des cellules piliers des lamelles branchiales, sans différence apparente d'immunomarquage entre les salinités (0.2 et 25 ppt). Pour définir une localisation plus précise, nous avons réalisé un marquage de cette pompe par immunogold suivi d'observations en microscopie électronique à transmission. Un examen à fort grossissement des cellules piliers a révélé un regroupement des particules d'or au niveau des microvillosités de la membrane plasmique apicale, soulignant la localisation de la VHA à ce niveau et suggérant son rôle dans la création d'un gradient électrique transépithélial permettant une absorption ionique. Un marquage subapical a également été observé. Ceci correspondrait à la présence de la VHA au niveau des vésicules intracellulaires, où elle est connue pour sa participation à leur acidification. Dans ces zones, soulignons que les mitochondries sont nombreuses, suggérant un transport ionique actif consommateur d'énergie au niveau de la membrane apicale. Le terme « portosome » a été proposé chez les insectes pour cette association (mitochondries-microvillosités apicales) dans les cellules transporteuses d'ions des tubes de Malpighi, d'intestin et des glandes salivaires (Harvey et al., 1981). La densité des particules d'or diminue en allant vers les expansions latérales des cellules piliers. Sur des animaux acclimatés à 25 ppt, les microvillosités apicales disparaissent et le nombre de particules d'or associées à cette région diminue fortement.

La NKA a été localisée par immunofluorescence au niveau des cellules septales sans différence visible entre salinités. Un double immunomarquage de la VHA et de la NKA a montré une localisation différentielle de ces deux pompes entre les deux types de cellules formant les lamelles branchiales. La NKA est localisée au niveau des invaginations membranaire des cellules septales et la VHA au niveau des microvillosités apicales et des compartiments cytoplasmiques des cellules piliers.

2-Branchiostégites

Concernant les branchiostégites, l'immunofluorescence a montré que la VHA et la NKA étaient colocalisées dans les mêmes cellules au niveau de l'épithélium interne. L'immunogold a montré que les particules d'or indiquant la présence de la VHA sont localisées dans les microvillosités apicales et dans le cytoplasme tandis que la NKA est localisée le long des invaginations basales de la membrane cytoplasmique. Sur des animaux acclimatés à 25 ppt, nous avons observé des changements identiques à ceux observés au niveau des branchies.

En conclusion, nous avons localisé pour la première fois la VHA chez une crevette palaemonidae au niveau des microvillosités apicales des cellules piliers et des vésicules

intracellulaires des branchies en eau douce. A 25 ppt, les microvillosités disparaissent et la VHA n'est présente qu'au niveau des vésicules intracellulaires. Ceci suggère l'implication de la VHA dans l'hyper-osmorégulation, en particulier lorsque les animaux sont exposés à l'eau douce, en créant un gradient favorisant l'entrée de Na^+ et/ou de Cl^- *via* des transporteurs et canaux spécifiques. En revanche la NKA est localisée au niveau des cellules septales des branchies. Cette distribution différentielle des deux pompes ioniques dans deux types de cellules renforce l'idée d'une implication différente et complémentaire des deux types de cellules dans les processus d'absorption ionique chez les crevettes palaemonidae (Fig. 8). Les cellules piliers et septales pourraient fonctionner comme un complexe cellulaire pour absorber ou sécréter des ions.

Résumé:

- Les lamelles branchiales de *M. amazonicum* comportent deux types de cellules associées, les cellules septales et les cellules piliers.
- Les cellules septales et piliers présentent des caractéristiques d'ionocytes. Cela suggère l'implication des deux types de cellules dans le transport transépithélial d'ions.
- La présence de microvillosités apicales, nombreuses en eau douce, au niveau des cellules piliers des branchies et de l'épithélium interne des branchiostégites semble être une adaptation aux faibles salinités permettant une absorption efficace d'ions.
- La VHA est localisée au niveau des microvillosités apicales des cellules piliers et des vésicules intracellulaires des branchies en eau douce, à proximité de mitochondries. A 25 ppt, les microvillosités disparaissent et la VHA n'est présente qu'au niveau des vésicules intracellulaires, renforçant l'hypothèse de l'implication de la VHA dans l'hyper-osmorégulation en eau douce chez *M. amazonicum*.
- La NKA est localisée au niveau des cellules septales des branchies.
- Les cellules piliers et septales pourraient fonctionner comme un complexe cellulaire pour absorber ou sécréter des ions.

A decorative banner with a central rectangular box containing the text "Article 2". The banner has a ribbon-like shape with pointed ends.

Article 2

Differential distribution of V-H⁺ type ATPase and Na⁺/K⁺ ATPase in the branchial chamber of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Grousset E.,

Anger K., Charmantier G., Lorin-Nebel C. (2014).

Cell and Tissue Research. 357: 195-206.

Differential distribution of V-type H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*

Nesrine Boudour-Bouchecker · Viviane Boulo ·
Mireille Charmantier-Daures · Evelyse Grousset ·
Klaus Anger · Guy Charmantier · Catherine Lorin-Nebel

Received: 24 September 2013 / Accepted: 5 February 2014 / Published online: 9 May 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract V- H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase were localized in the gills and branchiostegites of *M. amazonicum* and the effects of salinity on the branchial chamber ultrastructure and on the localization of transporters were investigated. Gills present septal and pillar cells. In freshwater (FW), the apical surface of pillar cells is amplified by extensive evaginations associated with mitochondria. V- H^+ -ATPase immunofluorescence was localized in the membranes of the apical evaginations and in clustered subapical areas of pillar cells, suggesting labeling of intracellular vesicle membranes. Na^+/K^+ -ATPase labeling was restricted to the septal cells. No difference in immunostaining was recorded for both proteins according to salinity (FW vs. 25 PSU). In the branchiostegite, both V- H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase immunofluorescence were localized in the same cells of the internal epithelium. Immunogold revealed that V- H^+ -ATPase was localized in apical evaginations and in electron-dense areas throughout the inner epithelium, while Na^+/K^+ -ATPase occurred densely along the basal infoldings of the cytoplasmic membrane. Our results suggest that morphologically different cell types within the gill lamellae may also be functionally specialized. We propose that, in FW, pillar cells expressing V- H^+ -ATPase absorb ions (Cl^- , Na^+) that are transported either directly to the hemolymph space or through a junctional complex to the septal cells,

which may be responsible for active Na^+ delivery to the hemolymph through Na^+/K^+ -ATPase. This suggests a functional link between septal and pillar cells in osmoregulation. When shrimps are transferred to FW, gill and branchiostegite epithelia undergo ultrastructural changes, most probably resulting from their involvement in osmoregulatory processes.

Keywords Osmoregulation · Na^+/K^+ -ATPase · V-type H^+ -ATPase · Gills · Branchiostegite

Introduction

Some crustaceans, in particular palaemonid shrimp, are able to migrate over large distances (Bauer 2004). These migrations, which are often related to reproduction and development, expose the animals at successive ontogenetic stages to different salinity regimes (Anger 2001). The species complex collectively referred to as *Macrobrachium amazonicum* is generally considered as an example of highly successful evolutionary invasions into FW environments (Anger 2013; Pileggi et al. 2013). Most populations are found in slowly flowing rivers near the sea, depending on estuarine water for complete larval development (McNamara et al. 1983; Moreira et al. 1986; Anger et al. 2009). Those near-coastal or estuarine populations represent the species *M. amazonicum* sensu stricto, which was originally described by Heller (1862) as *Palaemon amazonicus* from a riverine habitat in the Amazon Delta (type locality in Heller's original description: "Amazon River"; according to labels on syntypes MHMW 562 and 563 deposited at the Naturhistorisches Museum, Vienna: Gurupá, state of Pará, northeastern Brazil; F. Mantelatto, personal communication). Other populations currently assigned to the same species are hololimnetic, spending their entire life cycle in land-locked freshwater habitats located up to several thousand kilometers from the sea. Some of these, however, may actually

N. Boudour-Bouchecker (✉) · M. Charmantier-Daures ·
E. Grousset · G. Charmantier · C. Lorin-Nebel
Université Montpellier 2, Equipe Adaptation Ecophysiologique et
Ontogénèse, UMR5119 EcoSyM, UM2-UM1, CNRS-IRD-Ifremer,
cc 092, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France
e-mail: nboudour@yahoo.fr

V. Boulo
Ifremer-LEAD, BP2059, 98846 Nouméa Cedex, New Caledonia

K. Anger
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
Biologische Anstalt Helgoland, 27498 Helgoland, Germany

represent closely related but separate species, as recently shown for *M. pantanalense* from the Pantanal, upper River Paraguay system (dos Santos et al. 2013). In those inland populations, or cryptic species, reproduction is independent of salt water (Magalhães 1985; Zanders and Rodríguez 1992; Odinetz-Collart and Rabelo 1996; Anger and Hayd 2010). In the present study, we focused on a population originating from the Amazon estuary, near the type locality of *M. amazonicum* (Heller). All life-history stages of this population tolerated brackish and sea-water conditions, being hyper-osmoregulators at salinities up to the iso-osmotic point (17 PSU) and hypo-regulators at higher salinities. Hyper-osmoregulation in freshwater, however, is absent or weak in the larvae (except for the first postembryonic stage, zoea I) and in early juveniles (Charmantier and Anger 2011). These ontogenetic patterns of osmoregulation and freshwater tolerance are congruent with a diadromous life cycle with hatching in rivers, a rapid passive zoeal downstream transport to brackish estuarine waters, where the subsequent larval development takes place and later an active upstream migration of juveniles and adults.

At low salinities, a hyper-regulating organism is exposed to osmotic water influx and diffusive ion loss. At high salinities, a hypo-osmoregulating animal undergoes the reverse passive fluxes. The main sites involved in compensating these passive fluxes are the branchial chamber including the gills and the branchiostegites that are constantly exposed to the external environment (Charmantier et al. 2009). In freshwater, several working models for Na^+ and Cl^- uptake have been established and seem to differ between crustacean groups (reviewed by Charmantier et al. 2009; Henry et al. 2012; McNamara and Faria 2012). In *M. amazonicum*, working models for Na^+ absorption across the gill lamellae have been suggested; they involve pillar and septal cells that are structurally and functionally linked (McNamara and Torres 1999; Belli et al. 2009; Faleiros et al. 2010). Na^+ would enter pillar cells through apical ion exchangers and/or channels located in the extensive evaginations and it would pass through basal junctions into the septal cytoplasm from where it is actively exchanged for K^+ to the hemolymph via the Na^+/K^+ -ATPase. Cl^- uptake is believed to depend on a functioning carbonic anhydrase and to proceed via apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter located in the pillar cells and basolateral Cl^- channels (McNamara and Faria 2012). These suggestions originate from previous models in other crustacean and fish species (Kirschner 2004; Freire et al. 2008; Evans 2008; Charmantier et al. 2009) but the exact mechanisms of chloride and sodium absorption are still unknown in palaemonid shrimps.

The V-type H^+ -ATPase (V- H^+ -ATPase) appears as a key enzyme for osmoregulation in many organisms (Forgac 1998; Beyenbach 2001; Kirschner 2004; Covi and Hand 2005). It was first isolated and characterized from intracellular vacuoles (Cidon and Nelson 1982; Moriyama and Nelson 1987) and has later been located in the plasma membranes where, in a

variety of animals, the enzyme energizes secondary ion transport across whole epithelia by delivering protons from the cytoplasmic to the extracellular medium (Wieczorek et al. 1991; Beyenbach 2001). In hyper-osmoregulating organisms such as freshwater crustaceans, amphibians and fish, an apical V- H^+ -ATPase would be involved in driving ion uptake (Nelson and Harvey 1999; Wieczorek et al. 1999; Kirschner 2004; Beyenbach and Wieczorek 2006). In the posterior gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, an apical V- H^+ -ATPase seems to be involved in electrogenic Cl^- absorption, as shown by significant decrease in net Cl^- influx across isolated and perfused gills after external application of bafilomycin, a V- H^+ -ATPase inhibitor (Onken and Putzenlechner 1995; Riestenpatt et al. 1995). Moreover, an apical V- H^+ -ATPase might, as in frog skin (Ehrenfeld et al. 1990; Harvey 1992) or in several fish species (Wilson et al. 2000), support electrogenic apical Na^+ uptake (Kirschner 2004). The involvement of the V- H^+ -ATPase in freshwater osmoregulation has been strengthened by studies on gene expression and protein activities (Faleiros et al. 2010; Lee et al. 2011; Towle et al. 2011). In *M. amazonicum*, the V- H^+ -ATPase B-subunit mRNA expression decreased significantly after acclimation from freshwater to 21 PSU (Faleiros et al. 2010). The V- H^+ -ATPase protein activity also decreases and becomes negligible after a 10-day acclimation period to 21 PSU (Faleiros et al. 2010). Similar results have been reported from a freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Weihrach et al. 2004; Firmino et al. 2011), from an intertidal species of crab, *Uca formosensis* (Tsai and Lin 2007) and a copepod, *Eurytemora affinis* (Lee et al. 2011).

The subcellular location of the V- H^+ -ATPase remains poorly explored in crustacean gills. Putzenlechner et al. (1992) were the first to localize V- H^+ -ATPase in the pillar cells of *Eriocheir sinensis* gills (reviewed by Freire et al. 2008). Knowing the exact cell distribution in osmoregulatory epithelia would be a powerful support to better understand its involvement in ion transport. In the present study, using immunofluorescence and immunogold, we localized the V- H^+ -ATPase in the gills and in the branchiostegites of the palaemonid shrimp *M. amazonicum* and investigated the effects of salinity variation on the main enzymes driving NaCl uptake (V- H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase). The ultrastructure of gill lamellae and branchiostegites has been specified as well as effects of salinity on these epithelia.

Materials and methods

Origin and maintenance of animals

Adult *Macrobrachium amazonicum* originating from the Amazon estuary (Pará State, northeastern Brazil) were obtained from the State University of Mato Grosso do Sul in

Aquidauana (Mato Grosso do Sul, MS, Brazil; for details, see Anger et al. 2009). Shrimps were transported in cooling boxes to the Helgoland Marine Biological Laboratory (Germany), where they were kept in freshwater (FW; total ion concentration 0.2 PSU; temperature 24 °C; for more details, see Anger et al. 2009; Charmantier and Anger 2011). Adult shrimp were fed with frozen pieces of marine isopods (*Idotea* spp.) and commercial aquarium food (Novo Tab, JBL). Oviparous females were maintained in aerated flow-through aquaria with 30 L of FW. Newly hatched larvae were collected in sieves (0.3 mm mesh size) receiving the overflowing water and subsequently reared in 10 PSU salinity in aerated 1-L beakers kept at 29 °C and a 12:12 h light:dark cycle.

Salinity acclimation

Three-week-old (2.7 mm cephalothoracic length) and 5-month-old juveniles (4–5 cm total length) (referred to as early and late juveniles, respectively) reared at 10 PSU salinity were stepwise transferred to FW (salinities 5, 2, and 0.2 PSU) or to diluted seawater (DSW) (salinities 20 and 25 PSU). Early and late juveniles were maintained for 2 weeks in FW or DSW. All animals used were at molt stage C. Molt stages were determined by observation of pleopods under a dissecting microscope.

Transmission electron microscopy (TEM)

Dissected pieces of gills and branchiostegites from FW- and DSW-acclimated late juveniles were fixed for 24 h at 4 °C in glutaraldehyde (2.5 %) in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer, pH 7.4. The hemolymph osmotic pressure was 414 ± 9 mOsm/kg for FW animals and 560 ± 16 mOsm/kg for DSW animals. Fixative osmolality was adjusted to 480–490 mOsm/kg for FW animals and to 550 mOsm/kg for DSW animals by, respectively, adding distilled water or seawater. Samples were then rinsed (3×5 min) in sodium cacodylate buffer and postfixed for 1.5 h in osmium tetroxide at 1 % in the same buffer on ice. Subsequent washings in distilled water and dehydration in graded ethanol series were followed by embedding in Epon resin. Transverse semithin (150 nm) and ultrathin (80 nm) sections were cut on a LKB BROMMA 8800 ultramicrotome. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted with aqueous uranyl acetate and lead citrate and were observed at an accelerating voltage of 100 kV using a JEOL 1200 EX2 transmission electron microscope. Quantitative measurements were derived from 3 animals. Six pictures from different gill lamellae were taken from each animal using the same conditions. Values are expressed as (mean \pm SD).

Western blots

The branchial chamber was dissected from early juvenile shrimps held either in FW or DSW; the epithelia were scraped on ice and homogenized in 500 μ L of ice-cold SEI-PI buffer (0.1 mol/L imidazole; 0.02 mol/L EDTA; pH 7.4) containing 75 μ L of protease inhibitors (PI) (Complete™, Mini, EDTAfree; Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany) with a 1-mL Wheaton glass potter. After 1 h incubation on ice, homogenates were centrifuged at 2,000g for 6 min at 4 °C. Pellets were resuspended in 125 μ L of 2.4 mmol/L sodium deoxycholate in SEI-PI buffer and centrifuged a second time (2,000g, 6 min, 4 °C). The resulting supernatants were stored at –20 °C. The protein content of the supernatants was determined using the Bradford method with a BSA (bovine serum albumin) standard. Twenty μ g of protein samples were then separated under denaturing conditions on a 3 % stacking and a 10 % running polyacrylamide gel. The protein size marker was a Precision Plus Protein Standard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Following the migration, proteins were transferred on a PVDF membrane (WESTRAN® Clear Signal; Schleicher and Schuell BioScience, Fontenay-sous-Bois, France) for 2 h 45 min using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Blots were blocked in Odyssey blocking buffer for 1 h at 37 °C. The PVDF membrane was then exposed to the primary antibody (Guinea pig polyclonal antibody raised against the V1 domain of V-H⁺-ATPase from *Manduca sexta*) (Huss 2001) at 1/1,000 in Odyssey blocking buffer overnight at 4 °C. After two washes in PBS-T (0.1 % Tween 20 in phosphate-buffered saline, pH 7.3) and one wash for 10 min in PBS at room temperature, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody at a 1/8,000 dilution [IRDye® 800 CW conjugated donkey (polyclonal) anti-Guinea pig IgG; LI-COR, Biosciences, USA]. Following three washes, the blots were visualized by immunofluorescence and the pictures were obtained using the Odyssey® imaging system.

Immunolocalization of V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase

Early juvenile shrimps acclimated to FW or to DSW were fixed for 24 h by immersion in Bouin's fixative. After rinsing in 70° ethanol, samples were fully dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Paraplast (Sigma). Transverse sections (4 μ m) were cut on a Leitz Wetzlar microtome, collected on poly-L-lysine-coated slides and dried overnight at 37 °C. Slides were then dewaxed (LMR) and rehydrated through a descending series of ethanol baths (100°, 95°, 90°, 70° and 50°) and then were washed in PBS. Slides were incubated in sodium citrate buffer and microwaved (at 80 % power 2×1 min) to reveal the antigenic sites. After cooling at room temperature, the slides were immersed for 10 min in a mixture of 0.01 % Tween 20, 150 mM NaCl in 10 mM PBS, pH 7.3. Tissue saturation was performed by incubation in a

solution of 5 % skimmed milk SM-PBS for 20 min. Following three washes in PBS, the slides were incubated for 2 h at room temperature in a moist chamber with a mixture of the rabbit polyclonal Na^+/K^+ -ATPase primary antibody at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (SantaCruz Biotechnology, Cliniscience) and the Guinea pig polyclonal V-H^+ -ATPase antibody at 1/100 dilution in 0.5 % SM-PBS (Huss 2001). Following washes, the slides were incubated with a mixture of secondary antibodies Rhodamine[®] donkey anti-rabbit IgG and AlexaFluor[®] 488 goat anti-Guinea pig IgG, (InvitrogenTM) at 4 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.5 % SM-PBS, respectively, for 1 h at room temperature. Control slides were exposed to the same conditions without primary antibody. After three washes, the slides were mounted in an anti-bleaching mounting medium (Gel/Mount, Permanent Aqueous Mounting; Biomeda, Plovdiv, Bulgaria) and observed with a Zeiss Axioimager[®] microscope equipped with a special filter for fluorescence (380–770 nm) and Axio-Vision 4© software.

Immunogold Electron Microscopy

Gills and branchiostegites from late juvenile shrimps acclimated to FW and DSW were fixed for 2 h with 2 % paraformaldehyde and 0.5 % glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.5, adjusted to hemolymph osmolality of animals acclimated to FW or to DSW. After dehydration and embedding in LR White, transverse ultrathin sections were cut on a Reichert TM60 ultramicrotome and collected on Formvar-coated nickel grids. Selected grids were hydrated in distilled water (5 min). The grids were successively preincubated on droplets of filtered PBS-BSA 2 % for 10 min and of normal goat serum at 1/30 for 30 min. The grids were then transferred to droplets of the primary antibody V-H^+ -ATPase Guinea pig or Na^+/K^+ -ATPase rabbit antibodies diluted to 1/150 or at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.2 % PBS-BSA, respectively and incubated in a wet chamber one night at 4 °C. The grids were washed in PBS-BSA (six times for 5 min) and incubated for 1 h in droplets of 20 nm gold-conjugated goat anti-Guinea pig IgG (Abcam[®]) or 10 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam[®]). After washing in PBS-BSA (three times for 5 min) and PBS (three times for 5 min), sections were stained with uranyl acetate (30 min) and examined with a JEOL 1200 EX2 transmission electron microscope. For controls, the procedure was the same but the grids were incubated without the primary antibody.

Results

Gill ultrastructure

No ultrastructural differentiation was noted when comparing the lamellae from different gills within an individual. Ultrastructural micrographs of *M. amazonicum* gills illustrate two

main cell types: septal and pillar cells (Fig. 1b–d). A network of hemolymph lacunae is located between the two cell types, as shown in Fig. 1c, d, where two rows of symmetrical lacunae are visible on both sides of the septal cells. The septal cells contain a voluminous oval or round central nucleus (Fig. 1c, d) and their cytoplasmic membrane is highly amplified by deep and numerous infoldings associated with abundant mitochondria (Fig. 1d). The pillar cells are distributed on either side of the septal cells (Fig. 1c, d). The pillar cells present apical flanges that are lateral expansions extending under a thin cuticle and which are in contact with adjacent flanges via junctional complexes (Fig. 1b, arrow). These flanges did not present any infoldings; mitochondria are present in the apical side of the flanges (Fig. 1c, d) but their number decreases toward their extremities (not shown). The hemolymph lacunae are detected at the basal sides of the flanges (Fig. 1b–d). The pillar cell bodies are rich in cellular organelles compared to the flanges and are in close contact with the septal cells. In some regions of the lamellae, two adjacent pillar cells connect to form a pillar (not shown).

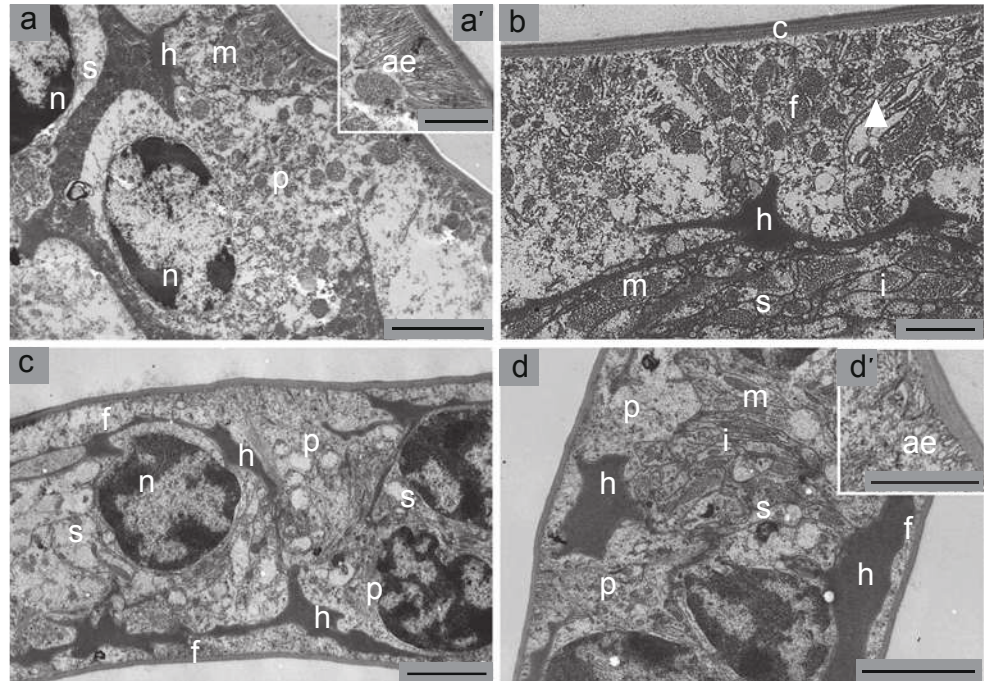
In FW, the apical surface of the pillar cells is highly amplified by an extensive system of evaginations associated with mitochondria and small vesicles (Fig. 1a, a'). These evaginations are observed above the perikaryon, becoming attenuated in the flanges (Fig. 1b). Acclimation to DSW (25 PSU) for 2 weeks induces various ultrastructural modifications in the gills such as a substantial decrease in the average thickness of the pillar cell flanges ($1.34 \mu\text{m} \pm 0.38$, $n=18$) (Fig. 1c, d) compared to the freshwater condition ($5.2 \mu\text{m} \pm 1.03$, $n=18$) (Fig. 1a, b) and an apparent decrease in the size and number of evaginations; only a few evaginations of the apical membrane are observed in DSW (Fig. 1d'). We did not observe any modification in the thickness of the intralamellar septal cells and of their structural organization between salinity conditions.

Branchiostegite ultrastructure

The branchiostegite comprises two epithelia separated by a wide hemolymph lacuna (Fig. 2a). The external epithelium is in close contact with the thick external cuticle; its thickness varies according to the molt stage (not shown). The internal epithelium, covered by a thin cuticle, presents ultrastructural features typical of an ion-transporting epithelium (Fig. 2a–c). Both epithelia are linked by pillar cells (Fig. 2a). In FW, the apical membrane of the cells lining the internal epithelium presents patches of evaginations associated with apical mitochondria (Fig. 2c, d) whereas the basal membrane forms many deep infoldings associated with abundant round or elongated mitochondria (Fig. 2c). Large and oval nuclei are located in the median zone. Irregularly shaped mitochondria can be observed around the nuclei (Fig. 2d). Acclimation to DSW induces ultrastructural modifications of the internal epithelium

Fig. 1 *M. amazonicum*.

Ultrastructure of transverse sections of gill lamellae from late juveniles held in freshwater (**a**, **a'**) and diluted seawater at 25 PSU (**c**, **d**, **d'**). *ae* apical evaginations; *c* cuticle; *f* flanges of pillar cell; *h* hemolymph lacuna; *i* membrane infoldings; *m* mitochondria; *n* nucleus; *p* pillar cells; *s* septal cells; *arrow* (**b**) junctional complex between two flanges. Scale bars 5 μ m, except for (**a'**, **d'**) 2 μ m



of the branchiostegite. The apical evaginations are absent (Fig. 2b, e) compared to those in FW. The basal infoldings are still present (Fig. 2b) but they seem less dense than in FW.

Western blotting

A polyclonal antibody raised against the native V1 domain of the V-H⁺-ATPase from *M. sexta* (Huss 2001) resulted in three main immunoreactive bands at 70, 56 and 29 kDa (Fig. 3) using *M. amazonicum* gill homogenates. These protein bands were identified as subunits A, B and E of the V-H⁺-ATPase by comparison with immunoreactive proteins of similar size in lysates of *M. sexta* and *Artemia franciscana* (Huss 2001; Covi and Hand 2005). Immunoreactive bands were absent on the blots incubated without primary antibody (not shown).

Immunolocalisation of V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase

Control sections without the primary antibodies showed no immunolabeling (not shown). In gill lamellae of *M. amazonicum*, immunofluorescence micrographs showed positive V-H⁺-ATPase immunoreactivity localized throughout pillar cells (Fig. 4a, b) without visible differences between salinities (25 PSU salinity not shown). Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity was restricted to the septal cells (Fig. 4a', b'). Double-staining of V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase showed no overlapping immunostaining (merge in Fig 4a'', b''). In the branchiostegite, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase colocalized in the same cells of the internal epithelium (Fig. 4b, b', b'').

Using immunogold, negative control without the primary antibodies did not show any immunolabeling (Fig. 5e). Gill pillar cells reveal immunogold labeling of the V-H⁺-ATPase at the apical evaginations (Fig. 5a, b) and also in clustered subapical areas suggesting labeling of vesicle membranes (Fig. 5c). The labeling density appears to decrease towards lateral expansions of the pillar cells (Fig. 5d). The septal cells expressed reduced V-H⁺-ATPase immunogold labeling in all regions of the cell (not shown). In the branchiostegite, gold particles indicating the presence of V-H⁺-ATPase were also localized in apical evaginations (Fig. 6a) and in electron-dense areas throughout the inner epithelium (Fig. 6b). Na⁺/K⁺-ATPase gold particles were localized densely along the basal infoldings of the cytoplasmic membrane (Fig. 6c). Negative control showed neither V-H⁺-ATPase (not shown) nor Na⁺/K⁺-ATPase immunolabeling (Fig. 6d).

Discussion

The gill ultrastructure of *M. amazonicum* corroborates the previous descriptions of this organ (Belli et al. 2009; Faleiros et al. 2010) and the currently accepted palaemonid gill model (McNamara and Torres 1999; McNamara and Faria 2012), where ion transport mechanisms seem to be located in functionally different cell types. The lamellar epithelium consists of pillar cells with extensive apical flanges and central septal cells, surrounded by hemolymph lacunae. This organization is similar to that observed in *M. olfersi* and *M. rosenbergii* (Freire and McNamara 1995; McNamara and

Fig. 2 *M. amazonicum*. Transverse semi-thin section of the branchiostegite from late juveniles (LJ) held in freshwater (FW) (a). Ultrastructure of the internal epithelium of the branchiostegite from LJ held in FW (c, d) and diluted seawater at 25 PSU (b, e). *ae* apical evaginations; *c* cuticle; *h* hemolymph lacuna; *i* membrane infoldings; *ie* internal epithelium; *m* mitochondria; *n* nucleus; *ee* external epithelium; *p* pillar cells. Scale bars 2 μ m, except for (a) 20 μ m

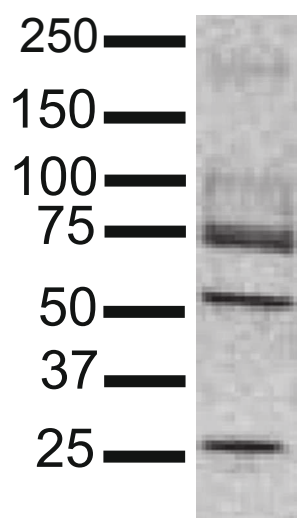
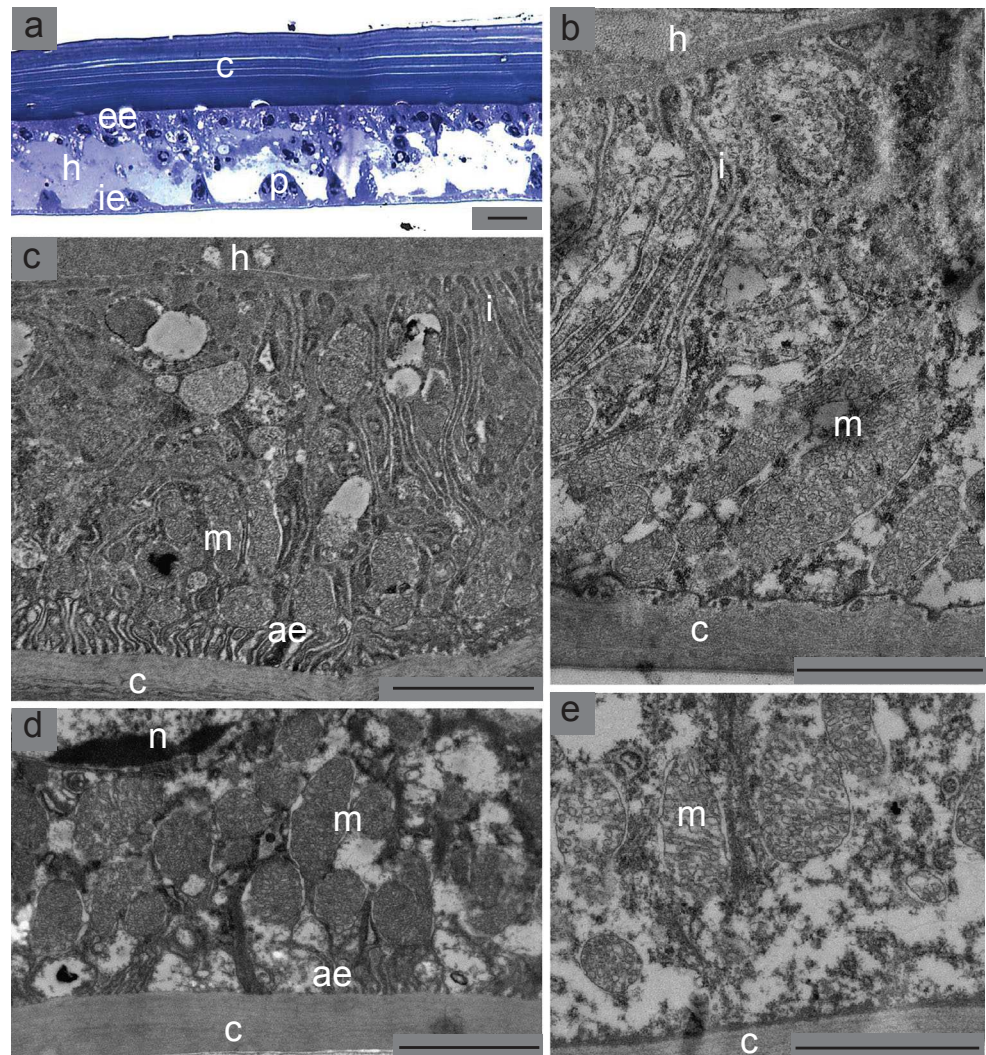


Fig. 3 *M. amazonicum* early juveniles. Western blot analysis of the branchial V-H⁺-ATPase after freshwater exposure. Molecular masses in kDa are indicated on the left

Lima 1997; França et al. 2013). The gill pillar cells appear to be involved in salt transports, given their intimate connection with both the external medium and the hemolymph. In FW-acclimated *M. amazonicum*, their apical surface is highly amplified by extensive evaginations associated with mitochondria in the sub-apical cytoplasm. These evaginations increase the apical membrane area available for the insertion of transport proteins such as the ATP dependent V-H⁺-ATPase, the close-by underlying mitochondria providing ATP to the enzyme. In the present study, we localized the V-H⁺-ATPase by immunofluorescence and immunogold using a polyclonal antibody raised against the native V1 domain of the V-H⁺-ATPase from *Manduca sexta*. The 3 bands that correspond to the subunits A (70 kDa), B (56 kDa) and E (29 kDa) in *M. amazonicum* blots have been previously detected in *Artemia franciscana*, where the same antibody has been used (Covi and Hand 2005). In *M. sexta*, supplementary bands have been detected (Huss 2001).

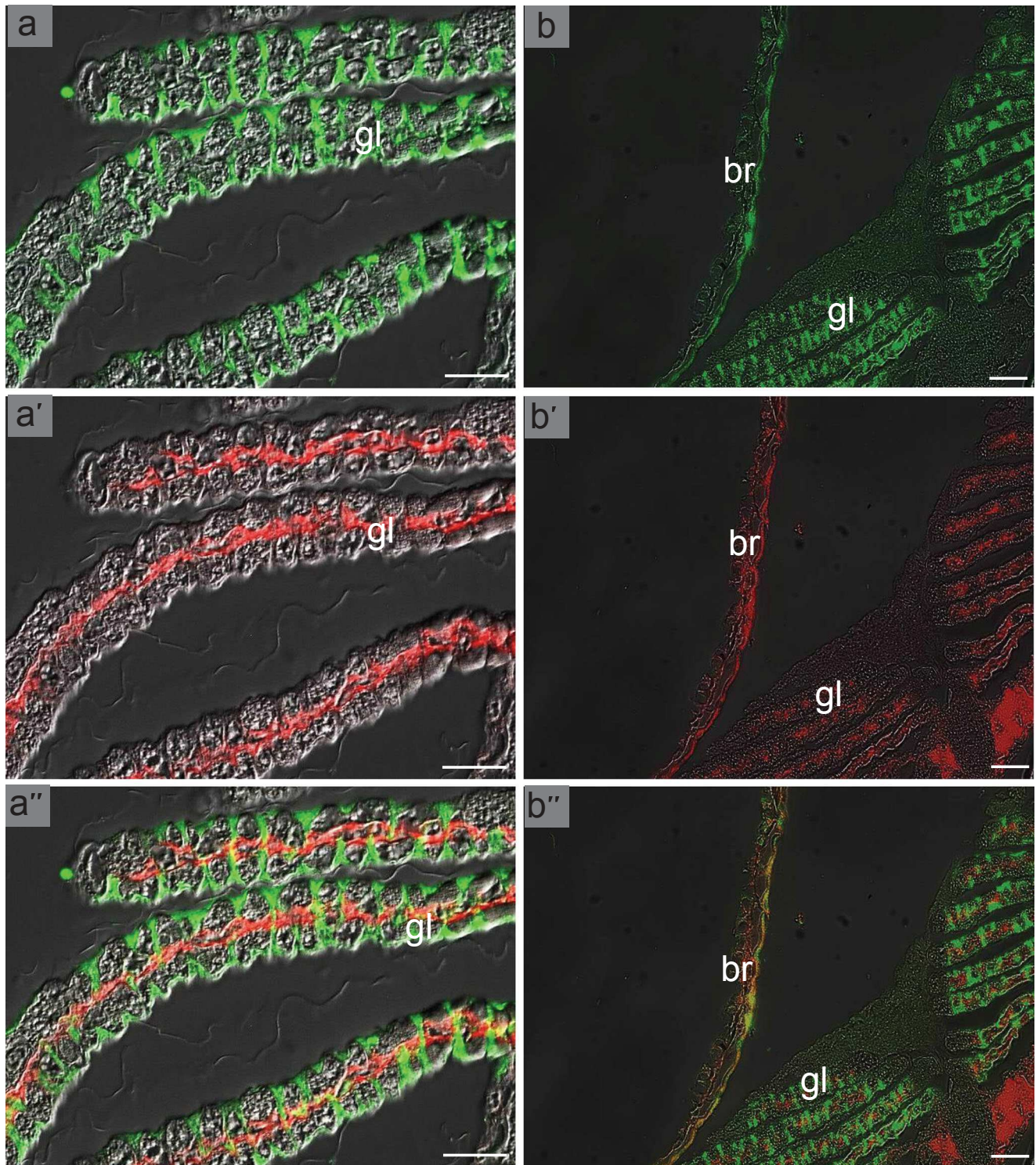


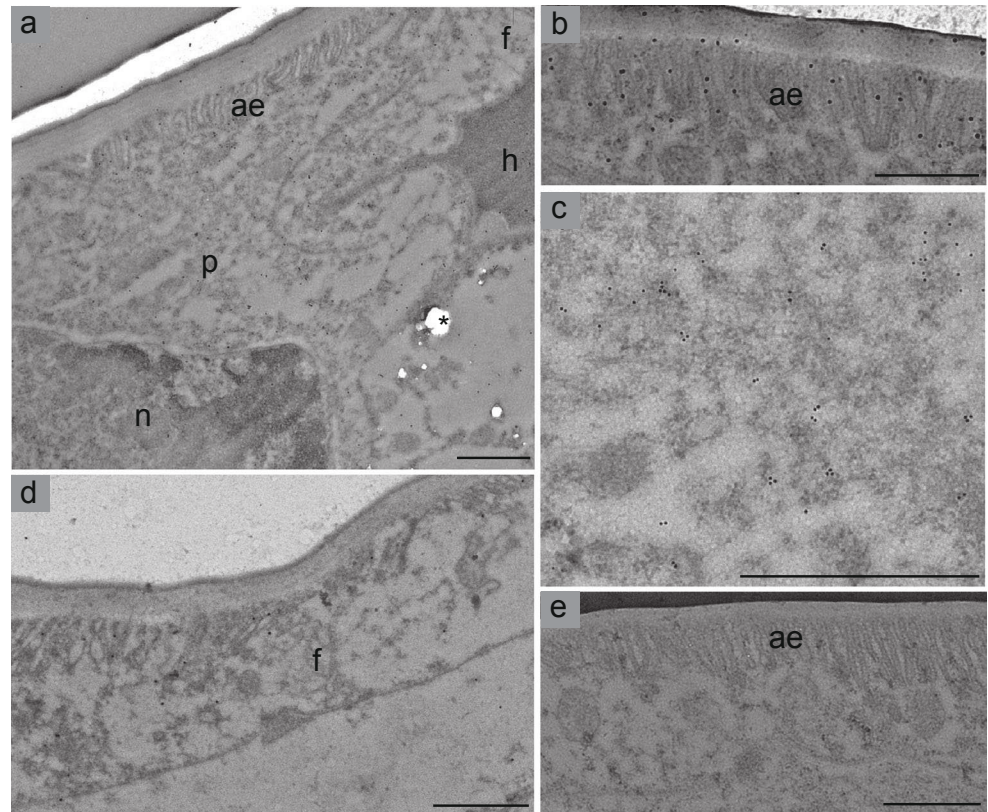
Fig. 4 *M. amazonicum*. Transverse sections of gill lamellae and branchiostegite from early juveniles held in freshwater. Pictures are taken with differential interference contrast. Immunolocalization of V-H⁺-

ATPase (green) (**a**, **b**) and Na⁺/K⁺-ATPase (red) (**a'**, **b'**). Merge of V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase (**a''**, **b''**). *br* branchiostegite; *gl* gill lamellae. Scale bars: 20 μm

In *M. amazonicum* gills, the V-H⁺-ATPase was localized only in the pillar cells, both in the apical and cytoplasmic cell part, without visible differences between salinities. A similar pattern of localization of V-H⁺-ATPase has been observed in

gill pillar cells of the crab *Eriocheir sinensis* (Putzenlechner 1994) but has never been shown in a Palaemonid shrimp. The cytoplasmic staining probably corresponds to intracellular vesicles, where the V-H⁺-ATPase may play a role in their

Fig. 5 *M. amazonicum*. Immunogold localization of V-H⁺-ATPase in transverse sections of gill lamellae from late juveniles held in freshwater. The labeling is observed in the pillar cells (**a**). The labeling is distributed in the apical evaginations (**b**) and in the subapical region clustering in electron dense areas suggestive of a vesicular location (**c**). The density of immunogold labeling decreases towards the lateral expansions (**d**). Negative control without gold particles (**e**). The asterisk in (**a**) indicates an artifact. *ae* apical evaginations; *f* flange; *h* hemolymph lacuna; *n* nucleus; *p* pillar cell. Scale bars 1 μ m

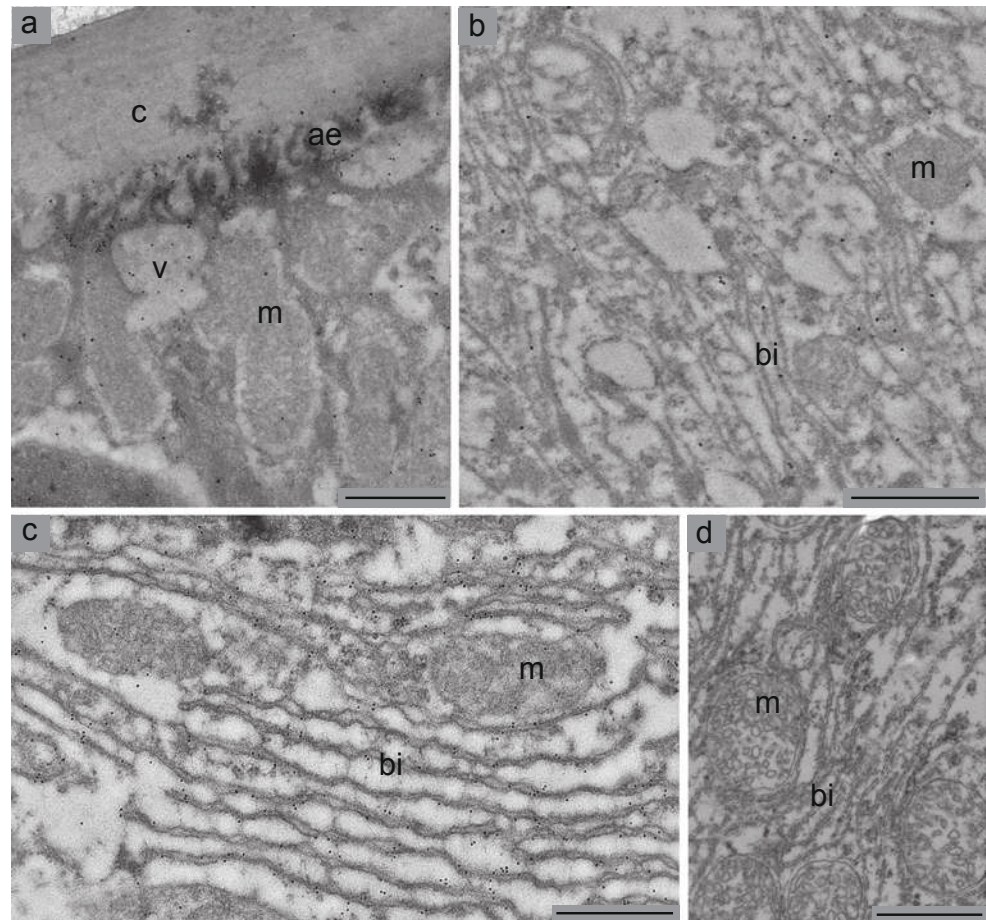


acidification (Beyenbach 2001; Kirschner 2004; Beyenbach and Wiczorek 2006). V-H⁺-ATPase activity and the V-H⁺-ATPase B-subunit mRNA expressions have been quantified in *M. amazonicum* gill homogenates (Santos et al. 2007; Faleiros et al. 2010). According to these authors, a striking decrease in V-H⁺-ATPase activity and expression was observed 10 days after acclimation of the shrimps to a salinity of 21 PSU. These findings point to the involvement of the V-H⁺-ATPase in active Na⁺ and/or Cl⁻ uptake in *M. amazonicum*, as generally accepted for FW-tolerant crustaceans (Freire et al. 2008; Charmantier et al. 2009). Moreover, in *Eurytemora affinis*, a copepod known as a rapid freshwater invader, evolutionary shifts in V-H⁺-ATPase function following freshwater invasions have been observed; freshwater populations exhibited a more significant increase in V-H⁺-ATPase activity in freshwater versus 15 PSU compared to saline populations (Lee et al. 2011). In *Callinectes sapidus*, the ENaC sodium channel inhibitor amiloride has been shown to inhibit unidirectional Na⁺ influxes, whereas it had no effect on Cl⁻ influx (Kirschner 2004). Research on isolated perfused gills of *E. sinensis* also showed independent electrogenic Na⁺ and Cl⁻ influx (Péqueux and Gilles 1988; Onken and Graszynski 1989). Onken and Putzenlechner (1995) proposed an electrogenic uptake of Cl⁻ via apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers and basolateral Cl⁻ channels driven by an apical V-H⁺-ATPase located in the apical evaginations of the pillar cells. Zare and

Greenaway (1998) proposed a model where V-H⁺-ATPase actively energizes Na⁺ uptake in the gills of crayfish, *Cherax destructor*. Such different ion transport models proposed for different crustacean groups could be related to their differential evolutionary histories, which may allow them to acquire variable adaptive strategies according to their habitats. Unlike in brachyurans, few studies are available on the osmoregulatory proteins involved in hyperosmoregulation in palaemonid species. In perfused *M. rosenbergii* gills, Torres (2006), using different inhibitors, showed that the V-H⁺-ATPase might be functionally linked to Na⁺ uptake through an apical Na⁺ channel and/or Na⁺/H⁺ exchanger and that carbonic anhydrase (CA) may provide the V-H⁺-ATPase with H⁺ (McNamara and Faria 2012). Whether chloride uptake also depends on V-H⁺-ATPase in palaemonid species remains unknown.

We have shown in *M. amazonicum* that a transfer from FW to a salinity of 25 PSU results in a decrease in the number and length of the apical evaginations. This can be interpreted as a plastic phenotypic response to an exposure to high salinities, with a reduction of the membrane surface for ion exchange. The thickness of the pillar cell flanges is also reduced compared to those exposed to freshwater, suggesting that the gill epithelium is less permeable to ion loss at reduced salinity. Similar ultrastructural modifications have been observed in the gill epithelium of *M. olfersi* (McNamara and Lima 1997).

Fig. 6 *M. amazonicum*. Immunogold localization of V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in transverse sections of the branchiostegite from late juveniles held in freshwater. The labeling indicating the presence of V-H⁺-ATPase (**a**, **b**) and Na⁺/K⁺-ATPase (**c**) is observed in the cells of the inner epithelium of the branchiostegite. V-H⁺-ATPase is localized in the apical evaginations (**a**) and in cytoplasmic vesicles (**b**). Na⁺/K⁺-ATPase is localized along the basal membrane infoldings (**c**). Negative control of Na⁺/K⁺-ATPase without any gold particle (**d**). *ae* apical evaginations; *bi* basal membrane infoldings; *c* cuticle; *m* mitochondria; *v* vesicles. Scale bars 1 μ m, except for (**c**) 0.5 μ m



Using immunogold, gold particles indicating the presence of V-H⁺-ATPase are less concentrated in the flanges. These regions also appear less dense in organelles than the pillar cell bodies, suggesting that the flanges are probably more involved in respiratory gas-exchanges rather than in osmoregulation.

The intralamellar septal cells of *M. amazonicum* present typical features of ion transporting epithelia like those seen in the shrimp *M. olfersii* (McNamara and Torres 1999) and in several other crustacean species (Towle and Kays 1986; Péqueux 1995; review in Charmantier et al. 2009). The cell membrane exhibits a conspicuously augmented membrane system with deep infoldings in contact with the hemolymph associated with numerous mitochondria. We localized the Na⁺/K⁺-ATPase by immunohistochemistry in the septal cells. In *M. olfersii*, it was suggested that the multiple, stacked infoldings may hold salt transport to the hemolymph given the localization of Na⁺/K⁺-ATPase activity in this region (McNamara and Torres 1999). Recent studies have also mentioned the presence of Na⁺/K⁺-ATPase by immunofluorescence in the intralamellar septum of *M. rosenbergii* (França et al. 2013). In the palaemonid shrimp model, Na⁺ is believed to enter the apical membrane of the pillar cell evaginations, cross the coupling junctions into the septal cell cytoplasm and

pass into the hemolymph via the Na⁺/K⁺-ATPase system located in the deep membrane infoldings (McNamara and Torres 1999). In our study, the strong immunofluorescence observed in the septal cells seems to corroborate this model. No visible differences were observed in Na⁺/K⁺-ATPase immunofluorescence labeling between salinities; however we know that gill Na⁺/K⁺-ATPase activity decreases in *M. amazonicum* following an exposure to a salinity of 25 PSU (Faleiros et al. 2010). Na⁺/K⁺-ATPase is believed to be involved in hyper- and hypo-osmoregulation in crustacean species. Its presence and low activity at high salinities might be sufficient to enable ion secretion. The NaCl secretion model has been well described in fish gills (Evans et al. 2005) and seems to involve a basal Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1). In *Macrobrachium* species, the Na⁺/K⁺-ATPase in the septal cell might generate an inward-directed Na⁺ gradient that drives Na⁺, Cl⁻ and K⁺ transport through a NKCC cotransporter. Cl⁻ may exit via apical Cl⁻ channels in the pillar cells, creating a negative electrical potential that drives paracellular Na⁺ efflux (McNamara and Faria 2012). Concerning the V-H⁺-ATPase, our results showed that it is present at 25 PSU and FW and no apparent difference in the localization and immunofluorescence intensity was recorded.

Faleiros et al. 2010 showed that the V-H⁺-ATPase has a lower activity in 21 PSU-acclimated shrimps compared to FW-acclimated shrimps. Combining these two results, we can propose that this low activity of V-H⁺-ATPase at high salinity is not related to an absence of the protein but that the V-H⁺-ATPase seems not to be activated. This suggests that the V-H⁺-ATPase is an enzyme that is post-transcriptionally regulated. However, more studies are necessary to fully understand the mechanisms involved in V-H⁺-ATPase activation.

In this study, we provide evidence on the differential spatial distribution of the two main pumps involved in osmoregulation (V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase) in *M. amazonicum* gills. Our data suggest that the highly differentiated pillar and septal cells form a cellular complex that is functionally linked in order to efficiently hypo- and hyperosmoregulate.

While the gills are known as the major osmoregulatory site that has been well documented in several species, fewer studies have been conducted on the branchiostegites, which are also believed to contribute to ion homeostasis (Felder et al. 1986). In *M. amazonicum*, the branchiostegites have been suggested as important sites for hypo-osmoregulation in larval stages given the high Na⁺/K⁺-ATPase abundance in the inner epithelium of an estuarine population (Boudour-Boucheker et al. 2013). The inner epithelium presents typical differentiations of an ion transporting epithelium: the apical cytoplasmic membrane presents patches of evaginations beneath a thin cuticle and the basal cytoplasmic membrane forms many deep infoldings separating cytoplasmic areas that contain abundant round or elongated mitochondria. A similar ion transporting branchiostegite epithelium has been described in the caridean shrimps *Palaemon adspersus* (Martinez et al. 2005) and *Crangon crangon* (Cieluch et al. 2005), the penaeid shrimp *Penaeus japonicus* (Bouaricha et al. 1994) and the lobster *Homarus gammarus* (Haond et al. 1998; Charmantier et al. 2001). One special feature of the inner epithelium of the branchiostegites in *M. amazonicum* exposed to FW is the close association between the abundant apical evaginations and numerous apical mitochondria, as in the pillar cells of the gills. This association has been previously described in ion transporting epithelia of insects (Harvey et al. 1981). In *Aedes aegypti* midgut, portasome-studded membranes near mitochondria have been observed through transmission electron microscopy. This provides evidence of an apical ion transport energized by the V-H⁺-ATPase (Zhuang et al. 1999).

In *M. amazonicum*, acclimation to FW induces marked ultrastructural changes in the inner epithelium of the branchiostegite and an increase in the epithelium thickness, probably resulting from an increase in cell volume. We also detected a development of membrane infoldings, an increase in the number of mitochondria, the appearance of numerous large vesicles and the development of apical evaginations. These structural features have also been reported from the osmoregulatory epithelia of other crustaceans maintained at

low salinity (Haond et al. 1998), seemingly linked to hyperosmoregulation. Unlike in gills, Na⁺/K⁺-ATPase and V-H⁺-ATPase were co-localized in the same epithelial cells of the branchiostegite, suggesting that the underlying mechanisms of ion transport in this tissue are different from those in the gills. As shown by immunogold, Na⁺/K⁺-ATPase is located in the deep basal membrane infoldings, where it probably contributes to an increased active Na⁺ uptake in freshwater. An increase in the number of mitochondria in these animals indicates higher energy requirements for enhanced active ionic transport processes. Na⁺/K⁺-ATPase was also localized in the inner epithelium of the branchiostegite of other decapod crustaceans such as the shrimp *Crangon crangon* and the crab *Eriocheir sinensis* (Cieluch et al. 2005, 2007). In *H. gammarus* subjected to a 20 PSU salinity, adjustment of the hemolymph osmolality correlates with increased specific activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the epipodites and the branchiostegites, where it was 1.5 times higher than in the gills (Flik and Haond 2000; Charmantier et al. 2001). These findings, together with our results obtained in *Macrobrachium*, suggest that the branchiostegites play an important osmoregulatory role in the ability of crustaceans to adapt to salinity changes. To our knowledge, this study shows for the first time that V-H⁺-ATPase is located in the branchiostegites, notably in the apical evaginations of the inner epithelium in *M. amazonicum* acclimated to freshwater. At a salinity of 20 PSU, the evaginations disappear and the density of gold particles in this region decreases. This suggests that, in FW, the presence of a membrane-associated V-H⁺-ATPase is essential for energizing ion transport.

In conclusion, the gills and the inner side of the branchiostegites of *M. amazonicum* are formed by a well-differentiated ion transporting epithelium and both house the two main pumps involved in ion transport. Our results suggest that the morphologically different cell types within gill lamellae may also be functionally specialized. We propose as a working hypothesis that, in FW, pillar cells expressing the V-H⁺-ATPase absorb ions (Cl⁻, Na⁺) that are transported either directly to the hemolymph space or through a junctional complex to the septal cells. Septal cells housing Na⁺/K⁺-ATPase may be responsible for active Na⁺ delivery to the hemolymph, which first passes through the pillar cells. This hypothesis suggests a clear functional link between septal and pillar cells to efficiently osmoregulate. When the shrimps are transferred to freshwater, gill and branchiostegite epithelia undergo considerable ultrastructural changes, most probably resulting from their involvement in osmoregulatory processes. Juvenile *M. amazonicum* are strong hyper-regulators in freshwater, maintaining hemolymph osmolality around 400 mOsm/kg. This ability may originate from the contribution of both pumps studied here, energizing ion uptake. Our findings, in conjunction with previous morphological and biochemical studies, provide a basis for a better understanding

of the relative importance of V-type H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase in disparate osmoregulatory challenges faced by juvenile *M. amazonicum* in estuarine habitats.

Acknowledgement We thank Dr. Markus Huss and Prof. Helmut Wiczeorek from the University of Osnabrück for providing the V-H⁺-ATPase antibody and Prof. Jehan-Hervé Lignot for his advice for immunogold. We thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS/CNEPRU) for the partial funding of this work.

References

- Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae. Crustacean issues 14. Balkema, Lisse
- Anger K (2013) Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. J Crustac Biol 33:151–183
- Anger K, Hayd L (2010) Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. Aquat Biol 9(3):251–261
- Anger K, Hayd L, Knott J, Nettelmann U (2009) Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. Aquaculture 287:341–348
- Bauer RT (2004) Remarkable Shrimps: Adaptations and Natural History of the Carideans. University of Oklahoma Press, Norman
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KCS, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM (2009) $Na^+ K^+$ -ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). Comput Biochem Physiol A 152:431–439
- Beyenbach K (2001) Energizing Epithelial Transport with the Vacuolar H^+ -ATPase. News Physiol Sci 16:145–151
- Beyenbach K, Wiczeorek H (2006) The V-type H^+ -ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol 209:577–589
- Bouaricha N, Charmantier-Daures M, Thuét P, Trilles JP, Charmantier G (1994) Ontogeny of Osmoregulatory Structures in the Shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). Biol Bull 186:29–40
- Boudour-Bouchecker N, Boulo V, Lorin-Nebel C, Elgero C, Grousset E, Anger K, Charmantier-Daures M, Charmantier G (2013) Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. Cell Tissue Res 353:87–98
- Charmantier G, Anger K (2011) Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. J Exp Mar Biol Ecol 396:89–98
- Charmantier G, Haond C, Lignot J, Charmantier-Daures M (2001) Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in homarid lobsters. J Exp Biol 204:967–977
- Charmantier G, Charmantier-Daures M, Towle D (2009) Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: Evans DH (ed) Osmotic and ionic regulation: Cells and animals. Taylor and Francis, London, pp 165–208
- Cidon S, Nelson N (1982) Properties of a novel ATPase enzyme in chromaffin granules. J Bioenerg Biomembr 14:499–512
- Cieluch U, Charmantier G, Grousset E, Charmantier-Daures M, Anger K (2005) Osmoregulation, Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase, and Ultrastructure of Branchial Epithelia in the Developing Brown Shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). Physiol Biochem Zool 78:1017–1025
- Cieluch U, Anger K, Charmantier-Daures M, Charmantier G (2007) Salinity tolerance, osmoregulation, and immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in larval and early juvenile stages of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapod, Grapsoidea). Mar Ecol Prog Ser 329:169–178
- Covi JA, Hand S (2005) V-ATPase expression during development of *Artemia franciscana* embryos: potential role for proton gradients in anoxia signaling. J Exp Biol 208:2783–2798
- Dos Santos A, Hayd L, Anger K (2013) A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. Zootaxa 3700(3):534–546
- Ehrenfeld J, Lacoste I, Garcia-Romeu F, Harvey BJ (1990) Interdependence of Na^+ and H^+ transport in frog skin. In: Truchot JP, Lahlou B (eds) Animal nutrition and transport processes, vol 6. Karger, Basel, pp 152–170
- Evans DH (2008) Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295:704–713
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid–base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. Physiol Rev 85: 97–177
- Faleiros RO, Goldman MHS, Furriel RPM, McNamara JC (2010) Differential adjustment in gill Na^+/K^+ - and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). J Exp Biol 213:3894–3905
- Felder JM, Felder DL, Hand SC (1986) Ontogeny of osmoregulation in the estuarine ghost shrimp *Callinassa jamaicensis* var. *luoisianensis* Schmitt (Decapoda, Thalassinidae). J Exp Mar Biol Ecol 99:91–105
- Firmino KCS, Faleiros R, Masui DC, McNamara JC, Furriel RPM (2011) Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). Comp Biochem Physiol B 160:24–31
- Flik G, Haond C (2000) Na^+ and Ca^{2+} pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the european lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute sea water. J Exp Biol 203:213–220
- Forgac M (1998) Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPases. FEBS Lett 440:258–263
- França JL, Pinto MR, Lucena MN, Garçon DP, Valenti WC, McNamara JC, Leone FA (2013) Subcellular Localization and Kinetic Characterization of a Gill (Na^+ , K^+)-ATPase from the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J Membr Biol 246:529–543
- Freire CA, McNamara JC (1995) Fine structure of the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. J Crustac Biol 15:103–116
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008) A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Comp Biochem Physiol A 151:272–304
- Haond C, Flik G, Charmantier G (1998) Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. J Exp Biol 201: 1817–1833
- Harvey BJ (1992) Energization of sodium absorption by the H^+ -ATPase pump in mitochondria-rich cells of frog skin. J Exp Biol 172:289–309
- Harvey WR, Cioffi M, Wolfersberger MG (1981) Portosomes as Coupling Factors in Active Ion Transport and Oxidative Phosphorylation. Am Zool 21:775–791
- Heller C (1862) Beiträge zur näheren Kenntnis der Macrouren. Sitzungsber Math-Naturwiss Kl Kaiserl Akad Wiss Wien 1862: 389–426, Plates 381–382

- Henry RP, Lucu C, Onken H, Weihrauch D (2012) Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid–base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol* 3:1–33
- Huss M (2001) Struktur, Funktion und Regulation der Plasmamembran V-ATPase von *Manduca sexta*. PhD thesis, Universität Osnabrück
- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207:1439–1452
- Lee CE, Kiergaard M, Gelembiuk GW, Eads BD, Posavi M (2011) Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65:2229–2244
- Magalhães C (1985) Desenvolvimento larval obtido em laboratório de palaemonídeos da Região Amazonica. I. *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). *Amazon-Limnol Et Oecol Reg Syst Fluminis Amazon* 9(2):247–274
- Martinez A, Charmantier G, Compère P, Charmantier-Daures M (2005) Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue Cell* 37:153–165
- McNamara JC, Faria SC (2012) Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J Comp Physiol B* 182:997–1014
- McNamara JC, Lima AG (1997) The Route of Ion and Water Movements Across the Gill Epithelium of the Freshwater Shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): Evidence From Ultrastructural Changes Induced by Acclimation to Saline Media. *Biol Bull* 192:321–331
- McNamara JC, Torres AH (1999) Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Zool* 284:617–628
- McNamara J, Moreira G, Moreira P (1983) The effect of salinity on respiratory metabolism, survival and moulting in the first zoea of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Palaemonidae). *Hydrobiologia* 101:239–242
- Moreira GS, McNamara JC, Moreira PS (1986) The Effect of Salinity on the Upper Thermal Limits of Survival and Metamorphosis during Larval Development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 50:231–238
- Moriyama Y, Nelson N (1987) The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *J Biol Chem* 262:9175–9180
- Nelson N, Harvey WR (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79:361–385
- Odinetz-Collart O, Rabelo H (1996) Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *J Crustac Biol* 16:684–688
- Onken H, Graszynski K (1989) Active Cl^- absorption by the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*) gill epithelium measured by transepithelial potential difference. *J Comp Physiol B* 159:21–28
- Onken H, Putzenlechner M (1995) A V-ATPase drives active, electrogenic and Na^+ -independent Cl^- absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *J Exp Biol* 198:767–774
- Péqueux A (1995) Osmotic Regulation in Crustaceans. *J Crustac Biol* 15:1–60
- Péqueux A, Gilles R (1988) The transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water. *Comp Biochem Physiol A* 89:163–172
- Pileggi LG, Magalhães C, Bond-Buckup G, Mantelatto FL (2013) New records and extension of the known distribution of some freshwater shrimps in Brazil. *Rev Mex Biodivers* 84:563–574
- Putzenlechner M (1994) Charakterisierung und Lokalisation einer Protonen-ATPase des V-typs in den Kiemen dekapoder Krebse (Crustacea, Dekapoda). PhD thesis, Freien Universität, Berlin
- Putzenlechner M, Onken H, Klein U, Graszynski K (1992) Electrogenic Cl^- uptake across the gill epithelium of *Eriocheir sinensis*: energized by a V-type ATPase? *Verh Dtsch Zool Ges* 85–160
- Riestenpatt S, Petrusch G, Siebers D (1995) Cl^- influx across posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*): potential energization by a V-type H^+ -ATPase. *Comp Biochem Physiol A* 110:235–241
- Santos LCF, Belli NM, Augusto A, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM (2007) Gill (Na^+ , K^+)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: Species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. *Comp Biochem Physiol A* 148:178–188
- Torres AH (2006) Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (Crustacea, Decapoda). PhD thesis, University of São Paulo
- Towle DW, Kays WT (1986) Basolateral localization of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J Exp Zool* 239:311–318
- Towle DW, Henry RP, Terwilliger NB (2011) Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp Biochem Physiol D* 6:115–125
- Tsai JR, Lin HC (2007) V-type H^+ -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J Exp Biol* 210:620–627
- Weihrauch D, McNamara JC, Towle DW, Onken H (2004) Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J Exp Biol* 207:4623–4631
- Wieczorek H, Putzenlechner M, Zeiskeg W, Klein U (1991) A Vacuolar-type Proton Pump Energizes K^+/H^+ Antiport in an Animal Plasma Membrane. *J Biol Chem* 266:15340–15347
- Wieczorek H, Grüber G, Harvey WR, Huss M, Merzendorfer H (1999) The plasma membrane H^+ -V-ATPase from tobacco hornworm midgut. *J Bioenerg Biomembr* 31:67–74
- Wilson JM, Laurent P, Tufts BL, Benos DJ, Donowitz M, Vogl AW, Randall DJ (2000) NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J Exp Biol* 203:2279–2296
- Zanders IP, Rodríguez J (1992) Effects of temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on oxygen consumption in larvae and adults of *Macrobrachium amazonicum* (decapoda, palaemonidae). *Comp Biochem Physiol A* 101:505–509
- Zare S, Greenaway P (1998) The Effect of Moulting and Sodium Depletion on Sodium Transport and the Activities of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, and V-ATPase in the Freshwater Crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). *Comp Biochem Physiol A* 119:739–745
- Zhuang Z, Linser PJ, Harvey WR (1999) Antibody to H^+ V-ATPase subunit E colocalizes with portosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti*). *J Exp Biol* 202(18):2449–2460

CHAPITRE V

Mécanismes d'osmorégulation chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense* : expression des osmoeffecteurs (Na^+/K^+ ATPase, V-type H^+ ATPase et l'échangeur Na^+/H^+) au cours de l'ontogenèse

**Chapitre V : Mécanismes d'osmorégulation chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense* :
expression des osmoeffecteurs (Na^+/K^+ ATPase, V-type H^+ ATPase et l'échangeur
 Na^+/H^+) au cours de l'ontogenèse**

1. Travaux antérieurs:

Les modèles de transports ioniques actifs dans les phyllobranchies des crustacés décapodes sont principalement basés sur des travaux effectués chez les crabes brachyours (Péqueux, 1995 ; Freire et al., 2008). Toutefois, les études structurales chez d'autres taxons, notamment les crevettes palaemonidae, ont suggéré l'existence d'autres modèles de transports ioniques à travers leur épithélium (McNamara et Torres, 1999; Belli et al., 2009; Furriel et al., 2010). La force motrice pour le transport de Na^+ et de Cl^- dans l'épithélium des branchies est la Na^+/K^+ ATPase (NKA) située au niveau de la membrane des ionocytes (Towle et Kays, 1986; McNamara et Torres, 1999; Furriel et al., 2010). La NKA est considérée comme le principal transporteur ionique (Lucu et Towle, 2003). Forte consommatrice d'énergie (ATP fournie par les mitochondries adjacentes), elle génère un gradient électrochimique par transport actif de 3 ions Na^+ du cytoplasme vers l'hémolymphe, en échange de 2 ions K^+ . Ce gradient électrochimique entraîne d'autres échanges ioniques à travers divers transporteurs ou canaux ioniques. Plusieurs de ces derniers ont été décrits chez les organismes aquatiques comme des candidats dans l'absorption et/ou la sécrétion du Na^+ et/ou du Cl^- comme le canal à Na^+ (ENaC), l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ou le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) (Lucu et Siebers, 1986; Burnett et Towle, 1990; Lucu, 1993 ; Freire et al., 2008 ; McNamara et Faria, 2012).

Parmi les candidats participant à l'absorption ionique figure la V-type H^+ ATPase (VHA), une enzyme qui utilise l'ATP et transforme l'énergie de l'hydrolyse d'ATP en une différence de potentiel électrochimique des protons à travers diverses membranes biologiques par le biais du transport actif primaire de protons. Le potentiel électrochimique transmembranaire des H^+ est utilisé à son tour pour entraîner une série de systèmes de transports actifs secondaires par l'intermédiaire de canaux ioniques, symports ou antiports. La VHA a tout d'abord été isolée et caractérisée dans les vacuoles intracellulaires; d'où la dénomination de vacuolaire (V-type H^+ ATPase) (Uchida et al., 1985 ; Cidon et Nelson, 1986). Son rôle a été décrit comme intervenant dans l'acidification de ces vésicules. Peu de temps après, elle a été identifiée dans les membranes plasmiques des cellules animales telles que les ostéoclastes, les tubules rénaux, l'épithélium ciliaire oculaire, les branchies des poissons et la peau des grenouilles

(Nelson et Harvey, 1999; Wieczorek et al., 1999). La VHA est composée de 14 sous-unités protéiques disposées en (i) un complexe cytoplasmique V1, responsable de l'hydrolyse de l'ATP, et (ii) un complexe membranaire V0, responsable de la translocation des ions H^+ à travers la membrane.

Il a été démontré que les amphibiens, les téléostéens, et au moins certains crustacés d'eau douce utilisent la VHA dans l'osmorégulation (Kirschner, 2004). Située dans la membrane plasmique, cette pompe à protons est impliquée dans l'absorption transépithéliale de Cl^- par les branchies de crabes d'eau douce (Weihrauch et al., 2004) et dans l'absorption de Na^+ par les branchies de poissons d'eau douce *via* des canaux et/ou échangeurs qui sont dépendant de la VHA (Kirschner, 2004; Wilson et al., 2000).

L'échangeur Na^+/H^+ (NHE) joue un rôle important dans l'homéostasie ionique, l'équilibre acido-basique, la régulation du volume cellulaire et dans la réponse aux facteurs de croissance des cellules de mammifères. Il est électriquement neutre, échangeant 1 Na^+ contre 1 H^+ dans la plupart des conditions physiologiques. En revanche, un NHE électrogénique a été identifié dans la membrane des tissus de crustacés, y compris dans les branchies du crabe *Carcinus maenas*, dans l'hépatopancréas du homard *Homarus americanus* et de la crevette *Macrobrachium rosenbergii* (Ahearn and Clay, 1989 ; Shetlar and Towle, 1989 ; Ahearn et al., 1990). La stœchiométrie du NHE électrogénique est de 2 Na^+ pour 1 H^+ , ce qui entraîne une polarisation du potentiel membranaire. En plus du NHE électrogénique bien caractérisé dans les épithéliums des crustacés, un NHE électroneutre a été décrit dans la membrane basolatérale de l'hépatopancréas du homard (*Homarus americanus*) (Dürr et Ahearn, 1996).

Le NHE, ainsi que le canal à Na^+ et le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC) ont été considérés comme des candidats à l'absorption de Na^+ par les branchies de crabes euryhalins vivant à faible salinité (Lucu et Siebers, 1986; Burnett et Towle, 1990; Lucu, 1993). Par contre, peu de données sont disponibles sur les effecteurs protéiques impliqués chez les crevettes.

Le NHE fait partie de la famille des SoLute Carriers (SLC). Neuf gènes ont été identifiés chez les mammifères, NHE1-9. Ces protéines ont 10 à 12 domaines transmembranaires. Le premier NHE des cellules animales séquencé était le NHE1 des cellules humaines (Sardet et al., 1989 et 1990). Lorsque les séquences d'acides aminés des différentes isoformes sont comparées par alignements chez les mammifères, de hauts degrés d'homologie sont identifiés, en particulier dans les domaines transmembranaires. La nature hautement conservée des NHE de vertébrés analysés à ce jour nous a suggéré que les isoformes électrogéniques et électroneutres du NHE des crustacés peuvent être caractérisées en utilisant des techniques de

biologie moléculaire basées sur les séquences de vertébrés, en dépit de la distinction fonctionnelle dans la stœchiométrie de ces échangeurs.

2. Résultats personnels:

Article 3 : “ Osmoregulation in two recently separated *Macrobrachium* species: ion transporter expression patterns during ontogeny ” est joint à la fin de ce paragraphe.

Dans ce travail, nous avons recherché des différences dans l'expression de protéines osmorégulatrices (NKA, VHA et l'échangeur Na^+/H^+ «NHE3») nous permettant de mieux comprendre les différences dans les capacités osmorégulatrices entre les deux espèces de *Macrobrachium* au cours de l'ontogenèse. Nous avons également testé l'effet de la salinité sur l'expression de ces protéines: les crevettes ont été acclimatées à deux salinités différentes, une salinité faible, ED ou 5 ppt, et une salinité comparativement élevée, 25 ppt pendant 24 heures pour les larves (zoé V et décapodite) et 48 heures pour les juvéniles. Ces temps, qui apparaissent courts, ont été choisis pour essayer d'obtenir des survivants parmi les stades de *M. panatanalense* qui tolèrent peu les fortes salinités. De plus, en complément à l'expression génique, nous avons localisé l'échangeur NHE3 chez *M. amazonicum* par immunofluorescence au niveau de la cavité branchiale au stade juvénile.

Ce travail préliminaire nécessite l'acquisition de certains résultats concernant le NHE3 (Western blot, immunomarquages supplémentaires) pour être publiable. Cependant, il sera présenté de la même manière que les chapitres précédents, sous forme d'un article partiellement rédigé, dans l'idée de pouvoir le soumettre dès l'obtention des résultats complémentaires.

Expression de la sous-unité alpha de la NKA via la quantification des transcrits

Chez les larves, le niveau des transcrits de la NKA a été plus élevé chez l'espèce P que chez l'espèce A aux deux salinités. Cela pourrait être lié aux différences développementales décrites précédemment entre ces deux espèces (article 1). L'espèce P montre un développement rapide des branchies aux stades larvaires, ce qui peut être une adaptation à leur vie en ED. En outre, des différences dans l'immunolocalisation de la NKA ont été observées entre espèces à ces mêmes stades larvaires. Chez l'espèce A, la NKA était surtout localisée au niveau de l'épithélium interne des branchiostégites. Chez l'espèce P, la NKA était fortement exprimée dans les branchies (article 1). L'expression plus élevée de la NKA chez

l'espèce P résulte donc probablement du développement plus hâtif des branchies chez cette espèce par rapport à l'espèce A.

Chez les juvéniles, aucune différence dans l'expression de la NKA n'a été détectée entre espèces aux deux salinités. A ce stade, les branchies des deux espèces sont au même niveau de développement. De plus, comme dans le milieu naturel les deux espèces se retrouvent alors en ED ou en eau légèrement saumâtre, elles ont probablement les mêmes besoins en terme d'absorption ionique, ce qui fait qu'on n'observe pas de différence dans l'expression de la NKA.

Des différences entre salinités dans l'expression de la NKA ont été mesurées aux stades décapodite et juvéniles de l'espèce P. Cette expression est plus élevée à 25 ppt par rapport à 5 ppt. Il est connu que l'activité de la NKA augmente dans les branchies des animaux aquatiques suite à un stress osmotique (Towle and Weihrauch, 2001 ; Charmantier et al., 2009). La salinité de 25 ppt représente un défi osmotique pour l'espèce P qui n'est jamais confrontée à cette salinité dans son habitat naturel, et à moyen terme elle n'y résiste d'ailleurs pas ou peu selon le stade. L'augmentation de l'expression de la NKA peut donc être interprétée comme une réaction de stress qui revient à la valeur initiale au bout de quelques heures à quelques jours selon l'espèce. L'espèce A est plus adaptée aux variations de salinité du fait des migrations ontogénétiques qu'elle entreprend durant son cycle de vie. On ne retrouve donc pas chez cette espèce de différence dans l'expression de la NKA selon la salinité.

Expression de la sous-unité B de la VHA via la quantification des transcrits

Chez les stades larvaires, la VHA est plus exprimée chez l'espèce P par rapport à l'espèce A. Les larves de l'espèce P vivent dans un milieu naturel d'ED, contrairement à celles de l'espèce A qui se développent dans l'eau saumâtre des estuaires. L'abondance des transcrits de la VHA chez l'espèce P par rapport à l'espèce A est donc physiologiquement pertinente du fait des besoins accrus des larves P pour absorber des ions en ED. Les systèmes dynamiques comme la VHA permettant l'excrétion des ions H^+ des cellules jouent un rôle primordial dans la maintenance de l'homéostasie des ions. Cette différence d'expression entre espèces pourrait être à l'origine de l'acquisition de la fonction d'hyper-osmorégulation chez les larves de l'espèce P.

Par ailleurs, nous avons constaté que chez l'espèce P, la VHA est plus exprimée à 5 ppt qu'à 25 ppt au stade zoé V. Ce résultat suggère le rôle potentiel de la VHA dans l'hyperosmorégulation dès les jeunes stades larvaires de cette espèce. Cependant aux stades juvéniles et décapodite nous n'avons pas trouvé de différences entre salinités dans l'expression de la VHA. Cela pourrait être lié au niveau de régulation génique différent de celui des premiers stades larvaires. Des mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels peuvent aussi être impliqués, comme la modulation de l'activité enzymatique de la VHA en fonction de la salinité du milieu, ou des modifications dans le trafic et l'insertion de cette enzyme dans la membrane plasmique (Towle et al., 2001; Henry et al., 2002; Lucu et Towle, 2003; Luquet et al., 2005; Masui et al., 2005; Chung et Lin, 2006 ; Lovett et al., 2006 a).

Chez les stades larvaires de l'espèce A, il n'y a pas de différence entre salinités dans l'expression des transcrits de la VHA. Comme nous l'avons montré dans l'article 1 sur l'ontogenèse des organes osmorégulateurs, à ces stades de développement (zoé V et décapodite) les lamelles branchiales de l'espèce A ne sont pas encore bien développées par rapport à celles de l'espèce P. La présence de protéines osmorégulatrices est corrélée avec l'état de développement des branchies, qui sont le site principal des échanges ioniques avec le milieu externe grâce à leur surface fortement amplifiée. On peut donc suggérer que la VHA n'est pas encore exprimée au niveau des branchies et donc l'effet de la salinité ne peut être observé. Chez les petits et grands juvéniles, les branchies sont matures et la VHA est plus exprimée à 5 ppt et en ED par rapport à 25 ppt, suggérant son implication dans l'hyperosmorégulation à faible salinité. Ceci est en corrélation avec l'écologie de l'espèce qui se trouve, à ces stades de développement et quelle que soit l'espèce, dans des milieux d'ED et qui a donc besoin de tout l'équipement protéinique nécessaire pour une absorption efficace des ions.

Expression du NHE3 via la quantification des transcrits, et immunolocalisation

Les études au niveau moléculaire chez les crustacés ont révélé un degré élevé de similitude entre les séquences de NHE par rapport aux isoformes de vertébrés, ce qui suggère un niveau remarquable de conservation moléculaire entre les organismes et donc l'importance du rôle que ces systèmes de transport ont joué au cours de l'évolution. Des études sur le NHE des moustiques ont montré que le NHE des Tubes de Malpighi présente plus de 60% et 77% d'identité, respectivement, avec les séquences nucléotidiques et d'acides aminés des domaines transmembranaires spécifiques du NHE du crabe, du NHE3 du lapin, du NHE3 humain et du

NHE3 du rat, ce qui suggère une forte homologie du NHE d'insectes avec d'autres NHE de crustacés et de mammifères.

Dans notre étude, nous avons recherché le NHE3 chez l'espèce A en ED. En utilisant un anticorps commercial contre le NHE3 humain, le NHE a été essentiellement localisé au niveau des cellules septales des lamelles branchiales. Nous avons également remarqué sa présence au niveau des cellules piliers de quelques lamelles branchiales (probablement les branchies antérieures). Cependant d'autres immunomarquages sont nécessaires pour confirmer cette localisation. De plus, afin de tester la spécificité de l'anticorps, un Western Blot sera réalisé. Les cellules septales n'ont aucun contact avec le milieu externe car elles sont entourées par l'hémolymphe mais aussi par les cellules piliers qui sont en contact avec le milieu externe. L'isoforme détectée dans les cellules septales serait alors responsable du passage du Na^+ de l'hémolymphe vers ces cellules et des protons vers l'hémolymphe. La NKA, par son gradient sodique, fascillite l'entrée de sodium dans ces cellules *via* le NHE (Fig. 8). Le rôle du NHE dans les cellules septales pourrait être la régulation du pH intracellulaire lors d'une acidose. L'isoforme détectée dans les cellules piliers par contre pourrait être impliquée dans l'absorption de Na^+ depuis le milieu externe vers la cellule puis vers l'hémolymphe *via* un canal à Na^+ . On peut donc suggérer comme dans les études sur l'hépatopancréas et les branchies de crustacés qu'il existe chez l'espèce A deux formes différentes du NHE (Fig. 8); l'une jouerait un rôle dans la régulation du pH intracellulaire (l'isoforme électroneutre des cellules septales où l'énergie nécessaire à l'éjection des ions H^+ est fournie par le gradient sodique entrant établi par la NKA); l'autre servirait à l'absorption de Na^+ mais aussi de cations bivalents du milieu externe (isoforme électrogénique qui serait en position apicale dans les cellules piliers). Cette isoforme pourrait donc avoir un rôle majeur dans les processus de calcification de la cuticule lors de la mue mais aussi dans l'absorption de Na^+ en milieu hypotonique.

Le niveau de transcrits du NHE3 chez les espèces A et P a montré que le NHE3 est plus exprimé à 5 ppt chez P au stade zoé V et chez A au stade décapodite, et que cette expression est généralement plus forte chez P que chez A. Cette différence interspécifique à certains stades de développement et certaines salinités peut provenir d'une utilisation lors des expérimentations de crevettes à des stades de mue différents entre les deux espèces, surtout pour les larves (voir Matériel et Méthodes). En position apicale, le NHE utilise le gradient électrochimique mis en place par un transporteur actif comme la VHA pour faire entrer un autre ion, notamment le Na^+ ou aussi le Ca^{2+} nécessaire pour la calcification de la cuticule

chez les crustacés en échange avec un ion H^+ . Il est donc clair qu'une hétérogénéité d'animaux en post-mue et d'autres en prè-mue pourrait provoquer des différences dans l'expression du NHE. Une autre hypothèse pour expliquer ces différences serait que le pH du milieu dans lequel vivent les crevettes A et P est plus ou moins variable et différent, ce qui fait que les deux espèces ont des réponses pour la régulation du pH qui sont différentes. Il est connu chez certains organismes aquatiques que l'expression et l'activité du NHE sont modulées par le pH intracellulaire ; suite à une acidose, le NHE est activé pour excréter des protons et rétablir le pH intracellulaire. On peut aussi lier ces différences d'expression du NHE3 aux différences développementales observées entre les deux espèces, ou P a des branchies plus développées (site majeur de l'osmorégulation) à ces stades larvaires que A.

Résumé:

- La NKA est plus exprimée chez les stades larvaires de l'espèce P, résultant probablement du développement plus hâtif des branchies chez cette espèce par rapport à l'espèce A.
- L'expression plus élevée de la NKA à 25 ppt par rapport à 5 ppt chez certains stades de l'espèce P peut être interprétée comme une réponse à un stress osmotique, contrairement à l'espèce A qui est plus adaptée aux variations de salinité.
- L'abondance des transcrits de la VHA chez les larves de l'espèce P est physiologiquement pertinente du fait des besoins accrus de ces larves pour absorber des ions à partir de l'ED, contrairement aux larves de l'espèce A qui se développent en eau saumâtre.
- Les différences d'expression de la VHA entre salinités observées chez les deux espèces indiquent que la VHA a probablement un rôle dans l'hyperosmorégulation. Celle-ci se met en place très tôt chez les jeunes stades larvaires, de façon temporaire (Z1) chez l'espèce A, mais durable pour l'espèce P. Ceci permet la survie de tous les stades post-embryonnaires de l'espèce P en ED.
- Le NHE-3 est localisé essentiellement dans les cellules septales, mais aussi dans les cellules piliers de certaines lamelles branchiales. Ces deux isoformes ont probablement des rôles différents du fait de leur localisation (une face à l'hémolymph, l'autre face au milieu externe).
- Les différences d'expression du NHE-3 entre espèces à certains stades et certaines salinités peuvent provenir du rôle du NHE-3 dans la régulation du pH intracellulaire et la calcification de la cuticule.



Osmoregulation in two recently separated *Macrobrachium* species: ion transporter expression patterns during ontogeny

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Anger K.,
Charmantier G., Lorin-Nebel C.

À soumettre prochainement à Journal of Comparative Physiology B.

Osmoregulation in two recently separated *Macrobrachium* species: ion transporter expression patterns during ontogeny

Nesrine Boudour-Bouchecker¹, Viviane Boulo², Mireille Charmantier-Daures¹, Klaus Anger³, Guy Charmantier¹, Catherine Lorin-Nebel¹

¹ Université Montpellier 2, Equipe Adaptation Ecophysiologique et Ontogénèse, UMR5119 EcoSyM, UM2-UM1, CNRS-IRD-Ifremer, cc 092, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

² Ifremer-LEAD, BP2059, 98846 Nouméa Cedex, New Caledonia

³ Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Biologische Anstalt Helgoland, 27498 Helgoland, Germany

Key words: Immunolocalization, salinity, crustaceans, branchial chamber, NHE3, V-type H⁺ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase.

Abstract

In this comparative study, the osmoregulatory mechanisms were analyzed in two recently separated species of *Macrobrachium*, *M. amazonicum* originating from the Amazon estuary (A), and *M. pantanalense* from inland waters of the Pantanal (P) (northeastern and southwestern Brazil, respectively). A previous investigation has shown that in the P species, all ontogenetic stages are able to hyper-osmoregulate in fresh water, whereas a complete absence of hypo-osmoregulation was observed at high salinities. In contrast, in the A species, all ontogenetic stages are able to hypo-osmoregulate, whereas only the first larval stage, late juveniles and adults are able to hyper-osmoregulate in fresh water. In this study, we investigated the expression patterns of osmoregulatory proteins (NKA alpha-subunit, VHA B-subunit and NHE3) following salinity acclimation and during ontogeny in both species. NHE3 was localized by immunofluorescence in the branchial epithelium in order to better understand ion transport mechanisms within this tissue. In larval stages, NKA expression is higher in the P than in the A species at both salinities whereas no difference was noted between species in the juvenile stage. This result is probably related to the previously described accelerated gill development in the P species. VHA is also more expressed in P than in A larvae. The capacity of P larvae to highly express these ion pumps might contribute to the higher ability of this species to hyper-osmoregulate in fresh water. In the A species, NHE3 was mainly localized in the septal cells, but also in the pillar cells of some gill lamellae. When comparing NHE3 expression between *Macrobrachium* species, differences were measured in larval stages at certain salinities, with higher expression in the P species. The potential role of NHE3 in branchial septal and pillar cells is discussed and an ion uptake model is proposed based on previous findings in these two *Macrobrachium* species and in other crustaceans.

Introduction

The Palaemonid shrimps are thought to originate from an ancestral tropical marine clade, which has shown an evolutionary tendency to adapt to non-marine conditions and to successfully invade estuarine and limnic environments (for a review see Anger, 2013; Freire et al., 2003; Bauer, 2004; Augusto et al., 2009). The *Macrobrachium* genus (Heller, 1862) is considered as a particularly successful invader of freshwater habitats, showing an extremely wide range of geographic distribution. In recent years, it has been suggested that, within *Macrobrachium amazonicum*, at least two different kinds of populations exist: (1) those living in the northern and northeastern coastal regions of Brazil (e.g. in the Amazon Delta); they all depend on brackish water to complete their life cycle; and (2) those living in landlocked inland waters such as the wetlands of the Pantanal region, southwestern Brazil (for review, see Anger, 2013, dos Santos et al., 2013). Based on differences in reproductive traits between populations (Odinetz-Collart and Rabelo, 1996), morphological and morphometric analyses (Porto, 2004), as well as significant variations in ecological, behavioral, and life-history traits (Hayd and Anger, 2013), dos Santos et al. (2013) suggested that there may be a complex of closely related but separate species rather than different populations of the same species. Corresponding to their different life styles (estuarine *versus* hololimnic), significant differences were also found in adaptive physiological traits especially in the osmoregulatory capabilities of the successive ontogenetic stages (Charmantier and Anger, 2011). In the hololimnetic shrimp from the Pantanal, all ontogenetic stages are able of strong hyper-osmoregulation in fresh water, but a complete absence of the physiological function of hypo-osmoregulation was observed. In contrast, estuarine *M. amazonicum*, are able to hypo-osmoregulate at all ontogenetic stages and hyper-osmoregulate in fresh water only in the first larval stage and, then, as late juveniles and adults (Charmantier and Anger, 2011). Altogether, recurrent observations of conspicuously contrasting life-history traits suggest diversification, and thus, have stimulated the present comparative study on osmoregulatory function during ontogeny between the two species (referred to as two populations in Boudour-Bouchecker et al., 2013).

Aquatic organisms face a challenge to cope with salinity fluctuations. An elaborated mechanism of membrane transport processes facilitates at high salinities rapid removal of excess ions from the hemolymph and at low salinities active ion absorption (Charmantier et al., 2009). The gills of marine and brackish-water crustaceans play a key role in the exchange of osmotically active substances between the environment and the internal medium. The presence of specialized ion transporting cells and the well-developed hemolymph supply

enable active transport of ions (Lucu and Siebers, 1986). Transport mechanisms in the gills of crustaceans include diffusion, carrier-mediated exchange and active transport (Lucu, 1990). In palaemonid shrimps, ion transporters and channels are located in two different cell types within gill lamellae: septal and pillar cells (McNamara and Faria, 2012). Na^+/K^+ ATPase (NKA) appears as one of the driving forces facilitating transepithelial transport mechanisms. This pump is located in the intralamellar septal cells as shown for *Macrobrachium amazonicum* (Boudour-Bouchecker et al., 2013). The other driving force, particularly at low salinity, is the V-type H^+ ATPase (VHA) located in pillar cells, particularly in the apical membranes (Boudour-Bouchecker et al., 2014). Studies on different crustacean species have produced a variety of models of osmoregulatory ion transport (Lucu, 1990; Towle, 1990; Taylor and Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Onken and Riestenpatt, 1998). Current models in palaemonid shrimps suggest that Na^+ is transported based on concanamycin-sensitive apical VHA where the primary active transport of H^+ drives secondary ion transport of Na^+ via an apical Epithelial Na^+ Channel (ENaC) (McNamara and Faria, 2012). Other models propose the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ symporter and the Na^+/H^+ exchanger (NHE) as possible routes for Na^+ entry (McNamara and Faria, 2012). In palaemonid shrimps, septal cells express the basal Na^+/K^+ ATPase (McNamara and Torres, 1999; Furriel et al., 2010 ; Boudour-Bouchecker et al., 2013) to drive Na^+ uptake, possibly sustained through Na^+ transporters or channels in the pillar cells. The presence of a NHE that would drive net uptake of extracellular sodium for the net extrusion of cytoplasmic protons has not been reported in palaemonid shrimp gills (Ahearn et al., 1999; McNamara and Faria, 2012). The reported biological functions of the NHE exchanger include intracellular pH and cell volume regulation as well as transepithelial Na^+ transport (Wheatly and Gao, 2004).

Eight isoforms of the Na^+/H^+ exchanger have been described in mammalian species, varying in their tissue and cellular locations and in their responses to regulatory factors (Brett et al., 2005). In teleost gills, Na^+/H^+ exchangers appear to have similar functions to those of other vertebrates, namely exchanging one Na^+ for one H^+ (Claiborne, 1998). The Na^+/H^+ exchangers have also been studied in many invertebrate organisms including in crustacean crab gills (*Carcinus meanas*, Shetlar and Towle, 1989), lobster and prawn hepatopancreas (*Homarus americanus*, Ahearn and Clay, 1989, *Macrobrachium rosenbergii*, Ahearn et al., 1990). These studies suggest that NHE proteins might be electrogenic and display a transport stoichiometry of $2\text{Na}^+/\text{1H}^+$ resulting in a polarization of membrane potential (Shetlar and Towle, 1989). This physiological property differs from those of vertebrate NHE where Na^+ uptake is achieved by electroneutral transport. Electrogenic NHE was also reported in the

echinoderm (*Pycnopodia helianthoides*) pyloric caeca (Ahearn and Franco, 1991), suggesting that electrogenic NHE may be widely distributed within invertebrates.

A NHE cDNA has been amplified and sequenced from gills of two crab species, *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus* (Newton et al., 1996; Towle et al., 1997). Closely related to the vertebrate isoforms previously sequenced, it is not known whether the cloned NHE similar to the electrogenic exchanger described in membrane vesicles from crustacean epithelia (Shetlar and Towle, 1989). Pullikuth et al. (2003) presented the relationship between vertebrate and invertebrate NHEs in a phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences. Interestingly, *Carcinus maenas* NHE was more closely grouped with insect NHE3 (*Aedes aygepti*, *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*) (Towle et al., 1997). In *C. maenas*, NHE is strongly expressed in gills, showing much lower abundance in all the other tissues examined suggesting a role in acid-base regulation, volume regulation and Na⁺ uptake (Towle et al., 1997). Since no evidence exists for the presence of NHEs in palaemonid shrimps, we have focused our attention on the NHE3 due to the similarity of crustacean NHE with the NHE3 of insects and mammals.

In this study, we investigated expression patterns of the NKA alpha-subunit, VHA B-subunit and NHE3, following salinity acclimation and during ontogeny in both species *Macrobrachium amazonicum* and *M. pantanalense*. Also, we investigated distribution of NHE3 in gill lamellae in order to formulate a comprehensive model to understand how each *Macrobrachium* species regulates ions following salinity fluctuations and if there are different mechanisms involved comparing both species.

Materials and methods

Origin and maintenance of animals

Adult *M. amazonicum* and *M. pantanalense* (abbreviated A and P thereafter) were obtained from the State University of Mato Grosso do Sul in Aquidauana (Mato Grosso do Sul, MS, Brazil; for details, see Anger and Hayd, 2010). Shrimps were transported in cooling boxes to the Helgoland Marine Biological Laboratory (Germany), where they were kept in fresh water (FW) (total ion concentration: 0.2 mg/l; 24°C; for more details, see Anger et al., 2009; Charmantier and Anger, 2011). Adult shrimps were fed with frozen pieces of marine isopods (*Idotea sp.*) and commercial aquarium food (Novo Tab, JBL). Ovigerous females were maintained in aerated flow-through aquaria with 30 l of FW. Newly hatched larvae were collected in sieves (0.3 mm mesh size) receiving the overflowing water and subsequently reared in 10 or 5 ppt salinity for *M. amazonicum* and *M. pantanalense*, respectively, in aerated

1 l beakers kept at 29°C and under a 12:12 h light:dark cycle. Except for the zoea I stage, which is fully lecithotrophic, the larvae were fed with freshly hatched *Artemia sp.* nauplii (Anger and Hayd, 2010).

Salinity acclimations

Larval stages (zoea V, decapodids) were acclimated for 24 h either to brackish water (5 ppt) or to diluted seawater (DSW) (25 ppt). Three-week-old juveniles (referred to as early juveniles) were acclimated for 48 h either to 5 ppt or to 25 ppt. Five-month-old juveniles (referred to as late juveniles) were stepwise transferred to FW (0.2 ppt) or to DSW (salinities 20 and 25 ppt) in which they were maintained for 2 weeks. These stages were chosen because of previously observed differences in their osmoregulatory capacities (Charmantier and Anger, 2011). After acclimation, all shrimps were anesthetized by speed freezing and then dissected and fixed in Bouin's fixative or in Trizol (see below).

RNA extraction and cDNA synthesis

The molt stage was checked in juveniles by microscopic examination of uropods, with choosing animals in stage C. The small size and speed of molt cycle in larvae prevented this examination. For the larval stages, whole animals were used. For early juveniles, only the cephalothorax with the gills, and for late juveniles only the gills were used. The tissues were scraped with sterile scalpels. Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, Val d'Oise, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with RNase-free DNase (Invitrogen) to remove any genomic DNA contamination. Quantification of total RNA was performed with a NanoDrop® ND-1000 V3300 Spectrophotometer (Nanodrop Technology Inc., Wilmington, Delaware, USA). Reverse transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase and random primers (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was stocked at -20°C.

NHE3 and EF α -1 partial sequencing

Degenerate primers (Table 1) were designed from Bioedit sequence alignments using NHE3 sequences of several species including: *Aedes aegypti* (AF187723), *Homo sapiens* (NM_004174), *Rattus norvegicus* (NM_012654 XM_346529), *Lepisosteus oculatus* (JF19071), *Eriocheir sinensis* (AF301159) and *Carcinus maenas* (U09274). For the Elongation Factor gene EF α -1, a housekeeping gene used as a reference standard, the alignment included: *Daphnia magna* (AB734039.1), *Alpheus thomasi* (AF310826.1), *Danio*

rerio (DQ083545.1), *Palaemonetes varians* (FJ654544.1), *Litopenaeus vannamei* (GU136229.1), *Saccharomyces cerevisiae* (M10992.1), *Homo sapiens* (NM_001402.5) and *Mus musculus* (NM_010106.2). Degenerate primers have amplified a unique band at the expected size (237 pb for NHE3 and 495 bp for EF). Fifty μ l of PCR product was purified (Invitrogen) and sequenced using a BigDye® Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All sequencing was performed on the Génotypage-Séquençage platform of IFR 119 (Montpellier, France) with an ABI Prism 3130 XL 16 capillary Genetic Analyzer instrument (Applied Biosystems). From these partial sequences, specific primers were designed for qRT-PCR (Table 1).

Quantification of NHE3, NKA and VHA expression by quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

The specific forward and reverse primers for the target genes, NKA alpha-subunit and VHA B-subunit were designed based on the published sequences in *M. amazonicum* (Faleiros et al., 2010) (Table 1). The qRT-PCR analyses were performed with a Light-Cycler™ system version 3.5 (Roche, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany), using 2.5 μ l of the LightCycler-FastStart DNA Master SYBRGreen ITM Mix (Roche), 0.75 μ L of each primer (reverse and forward at 0.5 μ M) and 1 μ L of cDNA. The qPCR conditions were denaturation at 95°C for 10 min, repeat of amplification (95°C, 15 s), hybridization (58°C, 5 s) and elongation (72°C, 10 s) 40 times, melting curve program at 60°C for 1 min and final cooling step at 40°C for 30 s. For each primer couple, the efficiency was determined and the melting curve was analyzed in order to check the presence of only one amplification product. For each reaction, the crossing point (CP) was determined. All samples were analyzed in triplicates and the mean CP was calculated. The results were normalized with the reference gene EF α -1. Ultra-pure water was used as a negative control in the qPCR. The relative expressions of NHE3, NKA and VHA to EF α -1 at each condition (species, salinities and stages) were calculated with the DDCT method and statistical analyses were performed on 13 animals per condition with one reading per individual.

Immunocytochemistry of NHE3

Three shrimps were used at each condition. Gills from FW and DSW-exposed shrimps were immersed in Bouin's liquid for 48 h, washed and dehydrated in ascending grades of ethanol prior impregnation and embedding in Paraplast® (Sigma-Aldrich, USA). Sections of 4 μ m were obtained with a Leitz microtome (Leica, Rueil- Malmaison, Ile-de-France, France) and mounted on glass slides treated with poly-L-lysine. Slides were dewaxed (LMR), rehydrated

through a descending series of ethanol (100 %, 95 %, 90 %, 70 %, 50 %) and then washed in phosphate-buffered saline (PBS). Slides were incubated in sodium citrate buffer and then microwaved (at 80 % power twice for 1 min) to reveal the antigenic sites. After being cooled at room temperature, the slides were immersed for 10 min in a mixture of 0.01 % Tween 20, 150 mM NaCl in 10 mM PBS, pH 7.3. Tissue saturation was performed by incubation in a solution of 5 % skimmed milk (SM)/PBS for 20 min. Following three washes in PBS, the slides were incubated in a moist chamber at 4°C for one night with the rabbit polyclonal NHE3 primary antibody (Covalab, pab0642) at a 1/50 dilution in 0.5 % SM/PBS. Following washes, the slides were incubated with the secondary antibody (AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen) at 10 µg/ml in 0.5 % SM/PBS for 1 h at room temperature. Control slides were exposed to the same conditions without primary antibody. Slides were mounted in an anti-bleaching mounting medium (Gel/Mount, Permanent Aqueous Mounting, Biomed, Plovdiv, Bulgaria) and observed with a Zeiss Axioimager microscope equipped with a special filter for fluorescence (380 nm to 770 nm) and the AxioVision 4 software. Fluorescence and differential interference contrast (DIC) images were taken in order to compare the overall tissue structure and the localization of proteins.

Statistical analysis

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test was performed to check the stability of the reference gene (EF). To compare gene expression between salinities, stages and species we used two-way analysis of variance (ANOVA).

Results

Gene expression during ontogeny (NKA, VHA and NHE3)

PCR amplification using degenerate primers resulted in single amplification product for each target transcript. PCR product for NHE3 was purified and sequenced. The respective nucleotide sequence was translated to ORFs that yielded high-scoring BLASTX matches to known sequences of NHE3 in GenBank.

NKA alpha-subunit expression

In the A species, there is no difference in the relative expression of NKA alpha-subunit between salinities in both larval stages studied as well as in juveniles (Fig. 1) and late juveniles (Fig. 2).

In the P species, there is no difference between salinities in the zoea V stage, however in the decapodid and juvenile stages, we observe a significant increase of NKA expression after a direct exposure to 25 ppt salinity.

In larval stages, NKA expression is higher in P than in A at both salinities whereas no difference was noted between species in the juvenile stage.

VHA B-subunit expression

In larval stages, VHA seems to be more expressed in P species compared to A species except in zoea V stage at 25 ppt. No difference was noted between salinities except at zoea V stage in P species where VHA is more expressed at 5 ppt salinity compared to 25 ppt.

In the juvenile stage, in A species, VHA is more expressed at 5 ppt compared to 25 ppt. In the P species, no difference was noted between salinities. Moreover, the A species seems to have higher VHA expression at 5 ppt than the P species.

In late juveniles, VHA expression in the A species is higher in FW than in the 25 ppt salinity (Fig. 2).

NHE3 expression

In the zoea V stage, no difference was noted between salinities in the A species. In the P species, a higher expression is observed at 5 ppt salinity compared to 25 ppt. A comparison between the species shows a higher expression in the P species at 5 ppt. In the decapodid stage, the A species has a higher NHE3 expression at 5 ppt salinity compared to 25 ppt whereas the opposite pattern was observed in the P species with a higher expression at 25 ppt. At this stage, we note a difference between species at 25 ppt with higher NHE3 expression in the P species.

In juveniles, no significant difference was noted between salinities and species (Fig. 1).

In late juveniles of the A species, no difference in NHE3 expression was noted between salinities (Fig. 2).

Immunolocalization of NHE3

Immunolocalization of the NHE3 in late juvenile *M. amazonicum* gills revealed positive immunostaining located mainly along the intralamellar septal cells (Fig. 3). Some gill lamellae (probably from anterior gills) showed immunostaining in the pillar cells underlying the cuticle. Control sections without the primary antibody showed no immunostaining.

Discussion

Na⁺/K⁺ ATPase (NKA)

The principal effector of ion uptake in various species of *Macrobrachium* is the ouabain-sensitive NKA, an ion transporting enzyme located in the numerous membrane invaginations of the mitochondria-rich, intralamellar, septal cells of gill lamellae (Freire and McNamara, 1995; McNamara and Lima, 1997; Boudour-Boucheker et al., 2013 and 2014). This enzyme actively transports Na⁺ to the hemolymph, and is responsible for the strong hyperosmoregulatory capacity of *Macrobrachium spp.* in fresh water.

In the present study, we measured a higher NKA expression in *M. pantanalense* (P species) than in *M. amazonicum* (A species) in the analyzed larval stages (zoea V and decapodid) at both salinities (5 and 25 ppt). However in the juvenile stage there is no difference between species. This result could be related to the developmental differences previously described between these two species (Boudour-Boucheker et al., 2013). The P species shows an accelerated gill development at the larval stages, which may be an adaptation to their development in fresh water. Moreover, in the zoea V and the decapodid stages, significant differences in NKA immunoreactivity were observed between species. In the A species, NKA immunoreactivity was weak in the gills and strong in the inner epithelium of the branchiostegites. The opposite pattern was observed in the P species, with a strong immunofluorescence of NKA in the gills and a weak immunofluorescence in the branchiostegites (Boudour-Boucheker et al., 2013). Thus probably, in the P species, the higher NKA expression results from more developed gills. We can thus hypothesize that in larval stages of the P species, the branchial NKA is involved in Na⁺ absorption from fresh water. In the A species, the less expressed NKA present in the branchiostegites would be sufficient to drive ion transport in brackish water environments.

In the P species, differences in NKA expression between salinities were measured in decapodid and juvenile stages. Higher expression of NKA is observed at 25 ppt compared to 5

ppt salinity. The NKA is known to increase in activity in gills of aquatic animals following an osmotic stress (Towle and Weihrauch, 2001). Salinity-induced variations in NKA alpha-subunit expression also occur in crab gill tissues (Lucu and Flik, 1999; Masui et al., 2005; Lovett et al., 2006). In the crab *Chasmagnatus granulata*, the transfer from a hyper-osmotic to a hypo-osmotic medium has induced an increase in NKA expression (Luquet et al., 2005). However, NKA alpha-subunit expression varies little in *M. olfersi* (Mendonça et al., 2007), *Callinectes sapidus* (Towle et al., 2001) and *Scylla paramamosain* (Chung and Lin, 2006), despite considerable alterations in gill NKA specific activity, suggesting a posttranscriptional regulation. Faleiros et al. (2010) have also studied NKA expression in addition to enzyme activity after salinity transfer in what they called *M. amazonicum* sampled from a lake in Brazil. This species has probably the same limnic lifestyle as *M. pantanalense*. The relative expression of NKA alpha-subunit in the gills increased markedly during short term (1 h, 5 h, 1 day) acclimation to 25 ppt salinity. This pattern of salinity-induced variations in NKA alpha-subunit expression has been observed in this study in P species after one day exposure time for larval stages and two days for juveniles. The regulation is probably accomplished by hormonal modulation of NKA expression, a mechanism that is well documented in euryhaline fish species (McCormick, 1995). These results imply that the energetic costs of osmoregulation in stressful conditions are met, at least in part, by enhanced NKA expression. This increase in NKA expression at high salinity in decapodid and early juvenile stages could also be related to the synthesis of new enzymes necessary for the preparation and successful transition during the molt of metamorphosis. According to Faleiros et al. (2010), following a long term (5-10 days) salinity acclimation to 25 ppt, branchial NKA activity is lower than in fresh water, while expression values are comparable to those in fresh water. From these results and ours, we can suggest that in the P species, NKA expression increases following a direct exposure to high salinities and decreases afterwards to values observed in fresh water. NKA is thus essential for both hyper- and hypo-ionic regulation as shown in many euryhaline crustaceans (Charmantier et al., 2009). In the A species, however, no effect of salinity on NKA expression has been measured during ontogeny. The 25 ppt salinity represents an osmotic challenge for the P species that never face such high salinities in their natural habitat. The A species, however, is more adapted to salinity variations owing to its diadromous migrations.

V-type H⁺ ATPase (VHA)

The V-type H⁺ ATPase appears as a key enzyme for osmoregulation in many organisms (Forgac, 1998; Beyenbach, 2001; Kirschner, 2004; Covi and Hand, 2005). In hyper-osmoregulating freshwater crustaceans, amphibians and fish, an apical VHA seems to be involved in driving ion uptake (Nelson and Harvey, 1999; Wicczorek et al., 1999; Kirschner, 2004; Beyenbach and Wicczorek, 2006). The involvement of the VHA in freshwater osmoregulation has been strengthened by studies on gene expression and protein activities (Faleiros et al., 2010; Lee et al., 2011; Towle et al., 2011). In *Eurytemora affinis*, a copepod known as a rapid fresh water invader, evolutionary shifts in VHA function following fresh water invasions have been observed; freshwater populations exhibited a more significant increase in VHA activity in fresh water versus 15 ppt compared to saline populations (Lee et al., 2011). In the natural habitat, unlike larval stages of A species who need brackish water for their development, those of P species live in fresh water. The higher VHA expression in larval stages of P species may be related to an increased need of these larvae to energize active ion uptake in fresh water by excreting H⁺ to the external medium. The high capacity of P species larvae to hyper-osmoregulate in fresh water (Charmantier and Anger, 2011) could be sustained by the capacity of expressing higher amounts of VHA than in A species larvae. This difference between A and P species could be responsible for the acquisition of the function of hyper-osmoregulation in P larvae. In zoea V stage of the P species, VHA is more expressed at 5 ppt salinity compared to 25 ppt. At this stage, gill lamellae are developed and the shrimps in situation of hyper-osmoregulation need to express the VHA involved in ion uptake. VHA activity and the VHA B-subunit expression have been quantified in adult *M. amazonicum* gills (Santos et al., 2007; Faleiros et al., 2010). According to these authors, a striking decrease in VHA activity and expression has been observed 10 days after acclimation of the shrimps from FW to 21 ppt. In decapodid and juvenile stages of P species, the absence of differences between salinities in VHA expression could be related to the acclimation time which is 24h for decapodids and 48h for juveniles. Long term salinity acclimation is probably necessary for this species to observe a salinity effect. In A species, we didn't measure any difference of VHA expression between salinities in larval stages. Larval stages of A species may not survive in fresh water because they are incapable of activating membrane-specific VHA gene transcription following salinity modification. This VHA expression pattern in the larvae of the A species is certainly due to an incomplete gill development (Boudour-Boucheker et al., 2013). In juveniles and late juveniles, however, the gills are mature and the VHA is more expressed at 5 ppt and FW compared to 25 ppt. This result enhances the importance of

branchial VHA in osmoregulation and salinity adaptation, and correlates with the ecology of this species which at these stages live in freshwater, and thus need an effective ion uptake *via* transporters like NHE probably energized by the VHA. Similar results have been reported from the freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Weihrauch et al., 2004; Firmino et al., 2011), and an intertidal crab species, *Uca formosensis* (Tsai and Lin, 2007).

Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3)

The highly conserved nature of the vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger analyzed to date suggests that the electrogenic and electroneutral NHE of crustaceans might be amenable to characterization using molecular biological techniques based on the vertebrate sequences, despite the functional distinction in the stoichiometry of exchange in the crustacean forms (Towel et al., 1997). In this study we have used available sequences of NHE3 from mammals, insects and some crabs to identify primers which have detected a single band at the expected molecular weight of NHE3. To our knowledge, we have characterized the NHE3 for the first time in the palaemonid shrimps. Among aquatic animals, NHE have been mostly studied in fish (Wilson et al., 2000; Tresguerres et al., 2005; Yan et al., 2007; Parks et al., 2008). In crustaceans, NHE have been detected in lobster hepatopancreas (Ahearn and Clay, 1989), in the gills of the crabs *Callinectes sapidus* (Shetlar and Towle, 1989) and *Carcinus meanas* (Towle et al., 1997) as well as in the hepatopancreas of the shrimp *Peneaus japonicus* (Vilella et al., 1998). In *A. species*, NHE3 was mainly localized in the septal cells, but also in the pillar cells of some gill lamellae. Results of studies on crustacean and echinoderm brush border membrane vesicles of gut, kidney and gill epithelia suggest that the NHE is electrogenic and displays a transport stoichiometry of 2Na⁺/1H⁺ (Ahearn and Clay, 1989; Shetlar and Towle, 1989; Ahearn and Franco, 1990 and 1991; Ahearn et al., 1990). Using crustacean gastrointestinal cells, the presence of two external cation binding sites with dissimilar binding properties was shown kinetically through external inhibition of Na⁺ transport (Ahearn and Clay, 1989; Ahearn and Franco, 1990 and 1991). It has also been reported that this electrogenic system transports calcium, since calcium and sodium were competitive inhibitors of one another, and the transport of each was blocked by amiloride, an inhibitor of NHE (Ahearn and Franco, 1990). Based on these studies, we can suggest that the NHE3 present in the pillar cells, which are in contact with both the external medium and the hemolymph, is an electrogenic isoform related to either Na⁺ absorption for ion homeostasis in fresh water or Ca²⁺ absorption during *M. amazonicum* molt cycle. Furthermore, an electroneutral and amiloride-sensitive NHE was identified in the hepatopancreatic epithelial cells in a basolateral

location (Duerr and Ahearn, 1996). This exchanger exhibited an apparent 1:1 transport stoichiometry and possessed low divalent cation sensitivity. Calcium transport at the basolateral membrane have been identified to occur by the combination of a $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ antiporter, an ATP-dependent Ca^{2+} ATPase and a verapamil-sensitive calcium channel (Ahearn et al., 1994). The NHE3 localized in the septal cells, in contact with the hemolymph but not with the external medium, could be electroneutral participating in pH and cell volume regulation rather than Na^{+} uptake from fresh water. When comparing NHE3 expression between A and P species, differences occur in larval stages at certain salinities, with higher expressions in the P species. These differences could be related to a use of shrimps at different molting stages. As an animal approaches molting, much of the calcium that is contained in the exoskeleton is transferred to the hemolymph across the gills and other permeable sites, or stored as calcium phosphate granules in epithelial cells (Greenaway, 1985). Following the loss of the old exoskeleton, the calcium stored is mobilized and again transferred to the hemolymph, where integumentary uptake mechanisms rapidly incorporate the divalent cation into the newly formed exoskeleton (Neufeld and Cameron, 1993; Flik and Haond, 2000). It is thus evident that using shrimps in pre-molt, inter-molt and post-molt stages could generate unexplainable differences when experiencing salinity effect on NHE3 expression.

In conclusion, according to our results and what is known on ion transport in crustacean gills, we can suggest a model of ion uptake in *M. amazonicum* and *M. pantanalense* gills. In this predicted model, the transporters, channels and ion pumps are spatially separated into two structurally distinct epithelial components. One of the driving forces for salt uptake is the NKA located in the membrane invaginations of the septal cells (Boudour-Bouchecker et al., 2014). The other driving force is the VHA located in the apical membrane of the pillar cells (Boudour-Bouchecker et al., 2014). Na^{+} enters pillar cell cytoplasm through an apical NHE3 and/or Na^{+} channels, diffusing across the pillar cell to the septal cells, providing Na^{+} for the NKA which transport it to the hemolymph. Cl^{-} enters pillar cell cytoplasm through an apical $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ antiporter and may exit directly to the hemolymph via Cl^{-} channels in the lower flange membrane, or passes through basal Cl^{-} channels into the septal cells and then into the hemolymph. Whether *M. amazonicum* and *M. pantanalense* gills also express a gene coding for an epithelial Na^{+} channel or $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ antiporter remains to be demonstrated.

References

- Ahearn, G.A., L.P. Clay** (1989). Kinetic analysis of electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiport in crustacean hepatopancreas. *American Journal of Physiology* 257: 484-493.
- Ahearn, G.A., P. Franco** (1990). Na^+ and Ca^{2+} share the electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter in crustacean antennal glands. *American Journal of Physiology* 259: 759-767.
- Ahearn, G.A., P. Franco, L.P. Clay** (1990). Electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchange in crustaceans. *Journal of Membrane Biology* 116: 215-226.
- Ahearn, G.A., P. Franco** (1991). Electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiport in echinoderm gastrointestinal epithelium. *Journal of Experimental Biology* 158: 495-507.
- Ahearn, G.A., Z. Zhuang, J.M. Duerr, V. Pennington** (1994). Role of the invertebrate electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter in monovalent and divalent cation transport. *The Journal of Experimental Biology* 196: 319-336.
- Ahearn, G.A., J.M. Duerr, Z. Zhuang, R.J. Brown, A. Aslamkhan, D.A. Killebrew** (1999). Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 1-18.
- Anger, K., L. Hayd, J. Knott, U. Nettelmann** (2009). Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture* 287: 341-348.
- Anger, K., L. Hayd** (2010). Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquatic Biology* 9: 251-261.
- Anger, K.** (2013). Neotropical *Macrobrachium* (caridea: palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* 33: 151-183.
- Augusto, A., P.A. Silva, L.J. Greene, H.J. Laure, J.C. McNamara** (2009). Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine Palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* 7: 113-122.
- Bauer, R.T.** (2004). Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. University of Oklahoma Press, Norman, pp 289.
- Beyenbach, K.** (2001). Energizing epithelial transport with the vacuolar H^+ ATPase. *News in Physiological Sciences* 16: 145-151.
- Beyenbach, K., H. Wicczorek** (2006). The V-type H^+ -ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 577-589.

- Boudour-Bouchecker, N., Boulo V., Lorin-Nebel C., Elgero C., Grousset E., Anger K., Charmantier-Daures M., G. Charmantier** (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell and Tissue Research*. 353: 87-98.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Grousset E., Anger K., Charmantier G., C. Lorin-Nebel** (2014). Differential distribution of V-H⁺ type ATPase and Na⁺/K⁺ ATPase in the branchial chamber of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell and Tissue Research*. 357: 195-206.
- Burnett, L.E., D.W. Towle** (1990). Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus* : Effects of ouabain and amiloride. *Journal of Experimental Biology* 149: 293-305.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures, D.W. Towle** (2009). Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: Evans D.H. (Ed.) *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. Taylor & Francis Group, London, p 165-208.
- Charmantier, G., K. Anger** (2011). Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hyporegulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396: 89-98.
- Chung, K.F., H.C. Lin** (2006). Osmoregulation and Na⁺/K⁺ ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 48-57.
- dos Santos, A., L. Hayd, K. Anger** (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa* 3700: 534-546.
- Duerr, J.M., G.A. Ahearn** (1996). Characterization of a basolateral electroneutral Na⁺/H⁺ antiporter in Atlantic lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic epithelial vesicles. *Journal of Experimental Biology* 199: 643-651.
- Faleiros, R.O., M.H.S. Goldman, R.P.M. Furriel, J.C. McNamara** (2010). Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺ and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology* 213: 3894-3905.
- Firmino, K.C.S., R. Faleiros, D.C. Masui, J.C. McNamara, R.P.M Furriel** (2011). Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 160: 24-31.

- Flik, G., C. Haond** (2000). Na^+ and Ca^{2+} pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute seawater. *The Journal of Experimental Biology* 203: 213-220.
- Freire, C.A., J.C. McNamara** (1995). Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *Journal of Crustacean Biology* 15: 103-116.
- Freire, C.A., F. Cavassin, E.N. Rodrigues, A.H. Torres, J.C. McNamara** (2003). Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology: Molecular and Integrative Physiology* 136: 771-778.
- Hayd, L., K. Anger** (2013). Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Revista de Biologia Tropical* 61: 39-57.
- Kirschner, L.B.** (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyper regulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology* 207: 1439-1452.
- Lee, C.E., M. Kiergaard, G.W. Gelembiuk, B.D. Eads, M. Posavi** (2011). Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65: 2229-2244.
- Lovett, D.L., T. Colella, A.C. Cannon, H. Lee, A. Evangelisto, E.M. Muller, D.W. Towle** (2006). Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biology Bulletin* 210: 132-139.
- Lucu, C., D. Siebers** (1986). Amiloride-sensitive sodium flux and potentials in perfused *Carcinus* gill: preparations. *Journal of Experimental Biology* 122: 25-35.
- Lucu, C.** (1990). Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97A: 297-306.
- Lucu, C., G. Flik** (1999). Na^+ - K^+ -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *American Journal of Physiology* 276: 490-499.
- Luquet, C.M., D. Weihrauch, M. Senek, D.W. Towle** (2005). Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *The Journal of Experimental Biology* 208: 3627-3636.
- Masui, D.C., R.P.M. Furriel, F.L.M. Mantelatto, J.C. McNamara, F.A. Leone** (2005). K^+ -phosphatase activity of gill (Na^+ , K^+) ATPase from the blue crab, *Callinectes sapidus danae*: low-salinity acclimation and expression of the subunit. *Journal of Experimental Zoology* 303: 294-307.

- McCormick, S. D. (1995).** Hormonal control of gill Na^+/K^+ -ATPase and chloride cell function. In: Fish Physiology, Ionoregulation: Cellular and Molecular Approaches. Wood C.M. and Shuttleworth T.J. (Eds). New York, Academic Press, Vol XIV: 285-315.
- McNamara, J.C., A.G. Lima (1997).** The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. Biological Bulletin 192: 321-331.
- McNamara, J.C., A.H. Torres (1999).** Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Zoology 284: 617-628.
- McNamara, J.C., S.C. Faria (2012).** Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. Journal of Comparative Physiology 182: 997-1014.
- Mendoca, N.N, D.C. Masui, J.C. McNamara, F.A. Leone, R.P.M. Furriel (2007).** Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill (Na^+/K^+)-ATPase α -subunit expression and K^+ -phosphatase activity. Comparative Biochemistry and Physiology, 146: 534-543.
- Nelson, N., W. Harvey (1999).** Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosine triphosphatases. Physiological Reviews 79: 361-385.
- Neufeld, D.S., J.N. Cameron (1993).** Transepithelial movement of calcium in crustaceans. Journal of Experimental Biology 184: 1-16.
- Newton, C.R., J.A. Tilghman, D.W. Towle (1996).** Direct sequencing of PCR amplified Na^+/H^+ antiporter cDNA from the blue crab *Callinectes sapidus*. Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory 35: 19-21.
- Odinetz-Collart, O., H. Rabelo (1996).** Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology 16: 684-688.
- Onken, H., S. Riestenpatt (1998).** NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. Comparative Biochemistry and Physiology 119: 883-893.
- Parks, S.K., M. Tresguerres, G.G. Goss (2008).** Theoretical considerations underlying Na^+ uptake mechanisms in freshwater fishes. Comparative Biochemistry and Physiology 148: 411-418.

- Péqueux, A.** (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15: 1-60.
- Porto, L.A.C.** (2004). Estudos morfológicos em populações do complexo *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em diferentes bacias hidrográficas brasileiras. Ph.D Thesis. University of São Paulo, Brazil, 170 pp.
- Pullikuth, A.P., V. Filippov, S.S. Gill** (2003). Phylogeny and cloning of ion transporters in mosquitoes. *Journal of Experimental Biology* 206: 3857-3868.
- Santos, L.C.F., N.M. Belli, A. Augusto, D.C. Masui, F.A. Leone, J.C. McNamara et R.P.M. Furriel** (2007). Gill (Na^+, K^+)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: Species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148: 178-188.
- Shetlar R.E., D.W. Towle** (1989). Electrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. *American Journal of Physiology* 257: 924-931.
- Taylor, H.H., E.W. Taylor** (1992). Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Harrison, F.W. and Humes, A.G. (Eds). Wiley-Liss, New York: 203-343.
- Towle, D.W.** (1990). Sodium transport systems in gills. In: *Comparative aspects of sodium cotransport systems*. Kinne R.K.H. (Ed.). Karger Publishing, Basel 241-263.
- Towle, D.W., M.E. Rushton, D. Heidysch, J.J. Magnani, M.J. Rose, A. Amstutz, M.K. Jordan, D.W. Shearer, W.S. Wu** (1997). Sodium/Proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. *Journal of Experimental Biology* 200: 1003-1014.
- Towle, D.W., D. Weihrauch** (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. *American Zoologist* 41: 770-780.
- Towle, D.W., R.S. Paulsen, D. Weihrauch, M. Kordylewski, C. Salvador, J.H. Lignot, C. Spanings-Pierrot** (2001). Na^+ , K^+ -ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. *Journal of Experimental Biology* 204:4005-4012.
- Towle, D.W., R.P. Henry, N.B.T Erwilliger** (2011). Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 6: 115-125.
- Tresguerres, M., F. Katoh, H. Fenton, E. Jasinska, G.G. Goss** (2005). Regulation of branchial V-H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase and NHE2 in response to acid and base infusions in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Experimental Biology* 208: 345-354.

- Tsai, J.R., H.C. Lin** (2007). V-type H^+ -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *The Journal of Experimental Biology* 210: 620-627.
- Vilella, S., V. Zonno, L. Ingrosso, T. Verri, C. Storelli** (1998). Electroneutral Na^+/H^+ exchange in brush-border membrane vesicles from *Penaeus japonicus* hepatopancreas. *American Physiological Society*, 486-493.
- Weihrauch, D., J.C. McNamara, D.W. Towle, H. Onken** (2004). Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 4623-4631.
- Wheatly, M.G., Y. Gao** (2004). Molecular biology of ion motive proteins in comparative models. *Journal of Experimental Biology* 207: 3253-3263.
- Wieczorek, H., G. Gruber, W.R. Harvey, M. Huss, H. Merzendorfer** (1999). The Plasma Membrane H^+ -V-ATPase from Tobacco Hornworm Midgut. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 31: 67-74.
- Wilson, J.M., P. Laurent, B.L. Tufts, D.J. Benos, M. Donowitz, A.W. Vogl, D.J. Randall** (2000). NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion transport protein localization. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2279-2296.
- Yan, J.J., M.Y. Chou, T. Kaneko, P.P. Hwang** (2007). Gene expression of Na^+/H^+ exchanger in zebrafish H^+ -ATPase-rich cells during acclimation to low- Na^+ and acidic environments. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 293: 1814-1823.

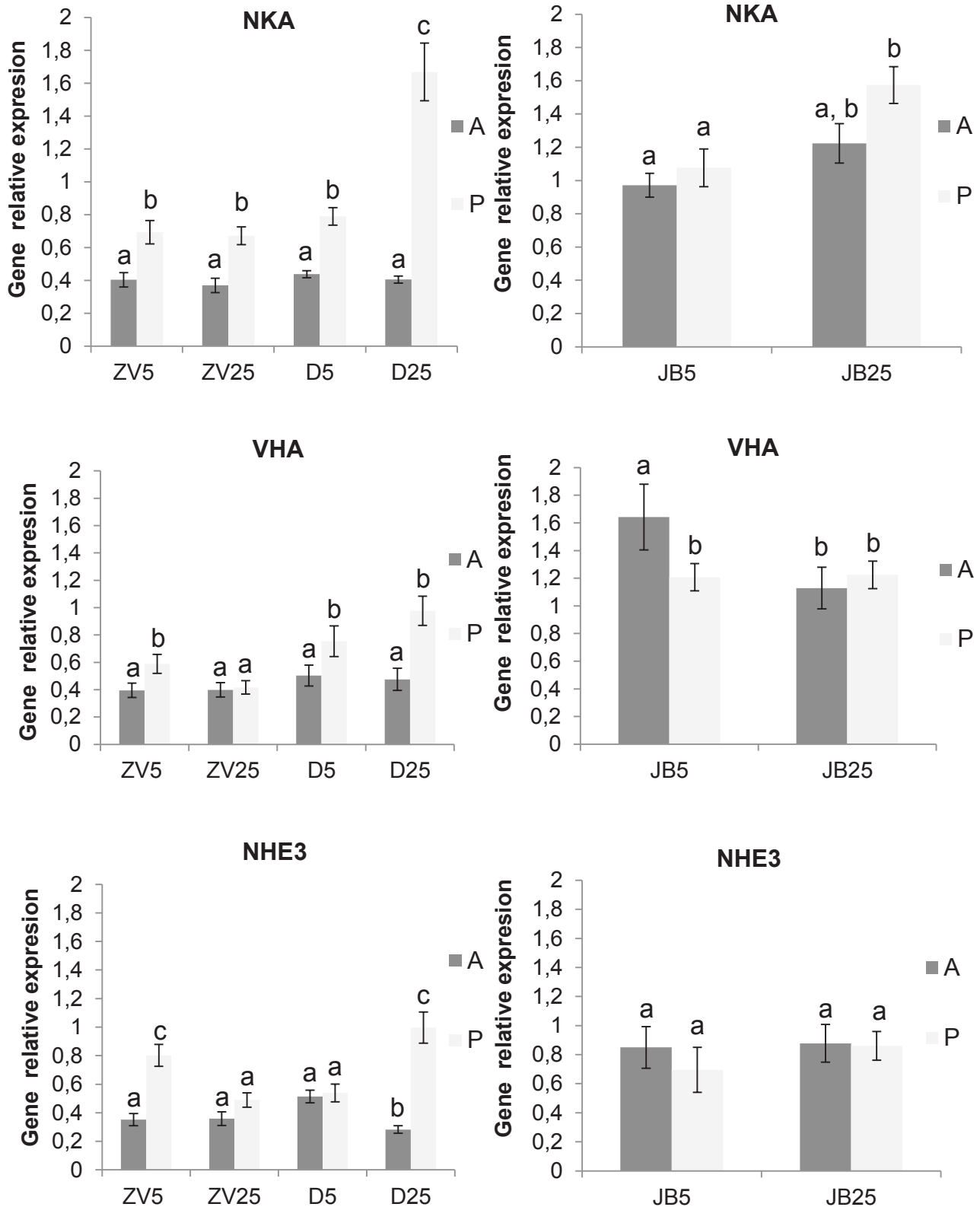


Fig. 1: Relative expression of NKA, VHA and NHE3 during ontogeny in A and P species acclimated to 5 and 25 ppt salinity. Results are expressed as the mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences. ZV: zoea V; D: decapodid; JB: juvenile branchial chamber.

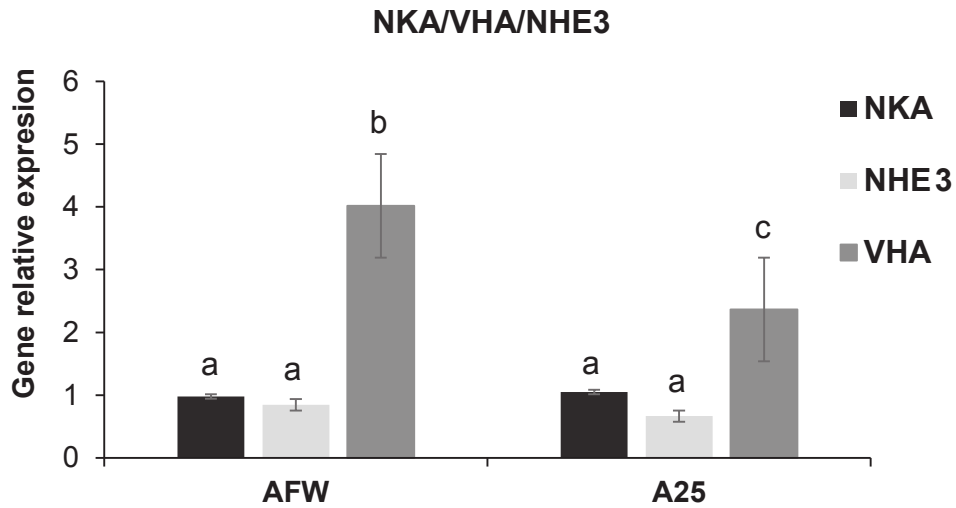


Fig. 2: Relative expression of NKA, VHA and NHE3 in late juveniles of A species acclimated to fresh water (FW) and 25 ppt salinity. Results are expressed as the mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences.

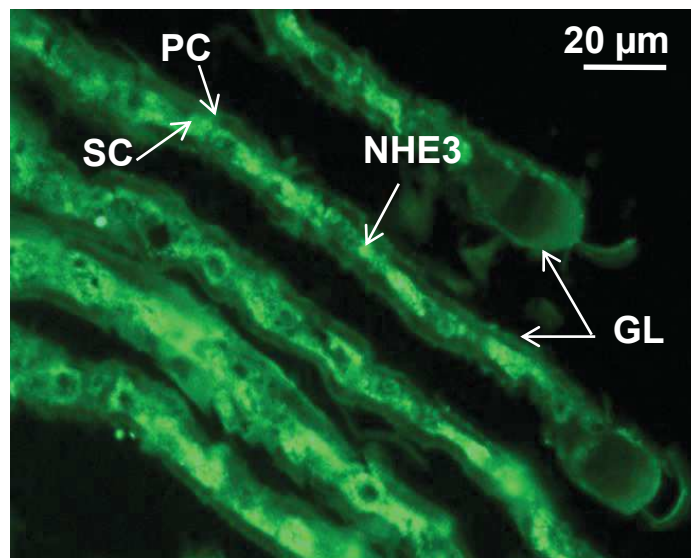


Fig. 3: Immunolocalization of NHE3 in gill lamellae (GL) of the A species acclimated to fresh water. Green fluorescence indicates the presence of NHE3 in the septal cells (SC). PC: pillar cells without immunostaining.

Chapitre VI

Discussion et conclusion générale

Chapitre VI : Discussion et conclusion générale

Les crevettes palaemonidae sont issues d'un clade ancestral marin tropical, qui a montré une tendance évolutive remarquable à s'adapter aux conditions non-marines, envahissant avec succès les milieux estuariens et limniques. *M. amazonicum* (A) est une espèce d'eau douce (ED) avec une stratégie d'exportation vers les estuaires des larves qui ont besoin d'eau salée pour se développer. Certaines populations de *M. amazonicum* se sont retrouvées au cours du temps isolées en ED, en particulier dans le Pantanal, où elles ont pu s'installer malgré l'interruption de l'accès à l'eau salée. Ces populations ont récemment été décrites comme une nouvelle espèce, *M. pantanalense* (P), dont tous les stades ontogénétiques peuvent vivre en ED, l'ensemble du cycle vital y étant donc accompli. Dans ce milieu, le challenge physiologique principal provient des valeurs très basses de pression osmotique (5-10 mOsm/kg) et de concentrations ioniques du milieu extérieur. Or chez un crustacé, les cellules ne peuvent fonctionner que si le milieu intérieur qui les baigne (l'hémolymphe) a une pression osmotique d'au moins 200 mOsm/kg (Charmantier et al., 2009). De ce fait, un organisme vivant en ED doit donc hyper-osmoréguler. Par rapport à *M. amazonicum*, une des adaptations physiologiques majeures de *M. pantanalense* acquise au cours de l'évolution est justement la capacité de TOUS les stades ontogénétiques, y compris les stades larvaires dès l'éclosion, à hyper-osmoréguler en ED. De plus, on constate chez *M. pantanalense* une perte de la capacité d'hypo-osmorégulation à des salinités élevées, capacité qui existe chez *M. amazonicum* (Charmantier et Anger, 2011). Cette différence physiologique reflète des styles de vie et des stratégies de reproduction différentes entre les deux congénères. Ces deux espèces représentent donc un bon modèle pour la reconstruction des transitions évolutives des crevettes de l'eau salée à l'ED. Afin de contribuer à comprendre les mécanismes d'osmorégulation chez ces deux espèces de *Macrobrachium* soumises à des milieux de salinités différentes, trois axes de recherche complémentaires ont été identifiés au cours de cette thèse :

Le premier axe de recherche correspond à une première question, à savoir quels sont les organes osmorégulateurs chez ces deux espèces, et à quel stade ontogénétique se mettent-ils en place ? Les performances osmorégulatrices varient en fonction du stade de développement, et les organes osmorégulateurs peuvent être plus ou moins développés selon le stade considéré. Nous avons constaté qu'au cours de l'ontogenèse, le développement des branchies progresse à des vitesses différentes chez les deux espèces de *Macrobrachium* A et

P. En règle générale, les espèces estuariennes de *Macrobrachium* possèdent un développement larvaire prolongé avec un nombre de stades supérieur à 8 avant d'atteindre le stade juvénile, alors que la plupart des espèces entièrement limniques montrent un développement abrégé avec un nombre de stades inférieur à 3 (Anger, 2001). En raison de différents modes de développement chez les espèces estuariennes et limniques, les larves nouvellement écloses peuvent présenter des structures morphologiques dans un état plus ou moins avancé. Ces deux espèces de *Macrobrachium* représentent toutefois une exception à la règle du développement abrégé en ED, comme elles passent toutes les deux par un développement étendu (Charmantier et Anger, 2011). Les larves de *M. pantanalense* montrent un développement accéléré des branchies par rapport à celles de *M. amazonicum*, ce qui peut être une adaptation de leur développement liée aux impératifs d'hyper-osmorégulation en ED. L'apparition de l'osmorégulation chez les stades larvaires est basée sur la régulation ionique réalisée par des cellules spécialisées (ionocytes), où l'enzyme Na^+/K^+ ATPase (NKA) est abondamment trouvée (Lignot et al., 1999; Lignot et Charmantier, 2001; Lucu et Towle, 2003; Cieluch et al., 2004; Charmantier et al., 2009). La présence de NKA est donc utilisée chez divers organismes pour attester de l'implication des organes dans l'osmorégulation. La surface d'échange de l'épithélium des branchiostégites avec le milieu externe (l'eau) est relativement faible par rapport à celle des branchies. Cependant, la présence de la NKA dans les branchiostégites dès l'éclosion au stade zoé I chez les deux espèces alors que les branchies ne sont pas encore formées, indique que ces structures sont impliquées dans des processus d'échanges actifs d'ions. Des résultats similaires ont également été rapportés chez *Penaeus japonicus* (Bouaricha et al., 1994) et *Crangon crangon* (Cieluch et al., 2005). Chez les stades larvaires ultérieurs, zoé V et décapodite, une différence dans la répartition de la fonction osmorégulatrice a été observée entre les deux espèces. La NKA a été essentiellement localisée au niveau des branchies chez *M. pantanalense* et au niveau des branchiostégites chez *M. amazonicum*. Ceci suggère que la forte capacité d'hypo-osmorégulation durant l'ontogenèse de *M. amazonicum* est liée aux transports ioniques dans les branchiostégites, alors que les lamelles branchiales ne sont pas complètement développées. Chez les juvéniles tardifs, une différence d'intensité de l'immunomarquage de la NKA au niveau de l'épithélium interne des branchiostégites a été constatée selon la salinité. A 25 ppt, le marquage a été plus intense qu'en ED, ce qui renforce l'idée que chez *M. amazonicum* les branchiostégites sont impliqués dans l'hypo-osmorégulation à forte salinité, avec une fonction sécrétrice. Concernant *M. pantanalense*, la capacité de tous les stades ontogénétiques à hyper-osmoréguler en ED provient probablement du développement précoce des branchies fonctionnelles, et la perte de l'hypo-osmorégulation peut être liée au manque de transports ioniques au niveau des

branchiostégites. À faible salinité, la présence de branchies entièrement fonctionnelles exprimant la NKA semble être essentielle dans les stades de développement tardifs pour la colonisation et l'adaptation à l'ED.

Les glandes antennaires des deux espèces de *Macrobrachium* se développent progressivement au cours de l'ontogenèse. Aux stades zoé I et zoé V, la NKA a été détectée dans les tubules collecteurs et la vessie. Cependant, la question de la fonctionnalité des glandes antennaires dans l'excrétion d'urine et la réabsorption d'ions chez les premiers stades du cycle de vie reste ouverte (Anger, 2001). Au stade décapodite, les tubules commencent à se différencier en deux parties distinctes, les tubules proximaux et distaux. Cette différenciation est à relier au modèle migratoire de *M. amazonicum*, qui comprend une migration des juvéniles depuis les estuaires vers les habitats fluviaux, où les glandes antennaires peuvent avoir un rôle plus important pour la réabsorption d'ions et la production d'urine hypotonique comme nous l'avons montré. Chez les juvéniles, la NKA a été détectée dans les différentes parties des glandes antennaires, la vessie et les tubules collecteurs. Un fort immunomarquage de la NKA a été observé dans la partie proximale du tubule. Ces résultats sont conformes à l'ultrastructure des cellules épithéliales des tubules collecteurs et de la vessie observée chez d'autres espèces de crustacés décapodes montrant des caractéristiques typiques des ionocytes (Khodabandeh et al., 2005 a, b). Ceux-ci permettent la formation d'une urine diluée. Khodabandeh et al., (2005 b) a également montré une forte concentration de la NKA dans les tubules proximaux des glandes antennaires de l'écrevisse, *Astacus leptodactylus*, et du homard, *Homarus gammarus*. Les tubules proximaux peuvent être le site principal de la réabsorption d'ions dans la glande antennaire. Les tubules distaux montrent un faible immunomarquage de la NKA par rapport aux tubules proximaux. Des études ultrastructurales menées sur d'autres crustacés décapodes suggèrent que la région des tubules distaux est plus active dans la sécrétion que dans la réabsorption (Peterson et Loizzi, 1974; Fuller et al., 1989; Khodabandeh et al., 2005 a). Les cellules de la vessie présentent des similitudes morphologiques avec les cellules des tubules proximaux, suggérant une analogie fonctionnelle entre ces deux sites (Khodabandeh et al., 2005 a, b). Comme la NKA est fortement présente dans les cellules de la vessie, une dernière modification du filtrat peut se produire avant la sortie de l'urine. Le coelomosac ne présente aucun marquage à la NKA. Cela correspond à la fonction d'ultrafiltration de l'hémolymphe implicite par l'ultrastructure des cellules podocytaires du coelomosac décrites chez *Astacus leptodactylus* et *Homarus gammarus* (Khodabandeh et al., 2005 a, b). Enfin, aucune différence dans l'intensité de l'immunomarquage des différentes parties de la glande n'a été détectée entre les salinités (5 et 25 ppt), ce qui n'exclue pas une différence dans l'activité

enzymatique de la NKA, comme observé chez le crabe *Ucides cordatus* (Harris et Santos, 1993). De plus, aucune différence dans l'immunomarquage des différentes parties des glandes antennaires n'a été détectée entre espèces. Ces résultats suggèrent l'implication des glandes antennaires chez les deux espèces de *Macrobrachium* dans la réabsorption ionique, principalement du sodium et du chlore, conduisant à la production d'une urine hypotonique. L'espèce P n'est donc pas plus équipée au niveau de la glande antennaire pour récupérer des ions et survivre en ED, d'où l'importance d'étudier d'autres sites osmorégulateurs comme les branchies.

Le deuxième axe de recherche concerne la question de l'organisation de l'épithélium branchial et de celui des branchiostégites, et l'effet de la salinité sur leur ultrastructure. Les observations en microscopie électronique nous ont permis de déterminer les types cellulaires présents et leur organisation. L'ultrastructure des branchies des deux espèces A et P corrobore les descriptions précédentes de cet organe (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010) et confirme le modèle décrit chez les crevettes palaemonidae (McNamara et Torres, 1999; McNamara et Faria, 2012), où les mécanismes de transport ioniques semblent être localisés dans des types cellulaires fonctionnellement différents. L'épithélium lamellaire se compose de cellules piliers avec des expansions latérales et de cellules septales au centre de la lamelle, entourées par des lacunes hémolympatiques. Cette organisation est similaire à celle observée chez d'autres crevettes palaemonidae comme *M. olfersi* et *M. rosenbergii* (McNamara et Lima, 1997; França et al., 2013). Les cellules piliers semblent être impliquées dans les transports ioniques, étant donné leurs connexions à la fois avec le milieu externe et l'hémolymphe. Chez les espèces A et P acclimatées en ED, la membrane apicale des cellules piliers est fortement amplifiée par de nombreuses et profondes microvillosités associées aux mitochondries situées dans l'espace sub-apical. Ces microvillosités augmentent la surface de la membrane apicale disponible pour l'insertion des protéines impliquées dans les transports ioniques en particulier en ED, et favorisent les échanges passifs. Ceci justifie également la présence de mitochondries sous-jacentes fournissant de l'ATP aux pompes consommatrices d'énergie. Les cellules septales présentent également des caractéristiques typiques des épithéliums transporteurs d'ions. La membrane de la cellule est amplifiée grâce à la présence d'un système membranaire avec des invaginations profondes en contact avec l'hémolymphe et associées à de nombreuses mitochondries. Chez *M. olfersi* comme chez d'autres crustacés, il a été suggéré que les multiples invaginations peuvent être le site des transporteurs ioniques compte tenu de la localisation de l'activité de la NKA dans cette région (McNamara et Torres, 1999).

Bien que les branchies soient connues comme le site majeur de l'osmorégulation qui a été le plus documenté chez les crustacés, peu d'études ont été menées sur les branchiostégites qui contribuent probablement à l'homéostasie ionique. Chez *M. amazonicum*, les branchiostégites ont été proposés dans cette étude comme des sites importants dans l'hypo-osmorégulation (article 1). L'épithélium interne des branchiostégites présente des différenciations caractéristiques des épithéliums transporteurs d'ions: la membrane cytoplasmique apicale présente des microvillosités sous une fine cuticule. La membrane basale est amplifiée par de profondes et nombreuses invaginations en association avec des mitochondries. Un épithélium semblable a été décrit chez les crevettes caridae *Palaemon adspersus* (Martinez et al., 2005) et *Crangon crangon* (Cieluch et al., 2005), chez la crevette pénéide *Penaeus japonicus* (Bouaricha et al., 1994) et chez le homard *Homarus gammarus* (Haond et al., 1998). Une particularité de l'épithélium interne des branchiostégites de *M. amazonicum* exposée en ED est l'association étroite entre d'abondantes microvillosités apicales et de nombreuses mitochondries sub-apicales, comme dans les cellules piliers des branchies. Cette association a été décrite précédemment dans les épithéliums transporteurs d'ions des insectes comme étant des portasomes (Harvey et al., 1981). Ceci fournit un argument supplémentaire en faveur d'un transport ionique apical.

Une fois les organes osmorégulateurs caractérisés, l'organisation et l'ultrastructure des cellules épithéliales établies, la question suivante qui constitue le troisième axe de recherche dans cette thèse concerne l'identification des transporteurs ioniques impliqués dans l'osmorégulation chez les deux espèces de *Macrobrachium*. Le but est d'élaborer un schéma cellulaire fonctionnel chez les deux espèces, qui permettrait de comprendre les particularités de l'osmorégulation chez *M. pantanalense* par comparaison avec celles de *M. amazonicum*. La NKA est considérée comme le principal transporteur ionique (Lucu et Towle, 2003). La NKA a été utilisée chez les espèces A et P pour caractériser les organes osmorégulateurs. Elle a été localisée par immunofluorescence au niveau des cellules septales des lamelles branchiales. Plusieurs modèles de mécanismes d'osmorégulation ont été proposés chez les crustacés pour expliquer les voies d'absorption et de sécrétion des ions (Freire et al., 2008). Dans le modèle des crevettes palaemonidae, le Na^+ semble entrer par les microvillosités apicales des cellules piliers, traverser les jonctions cellulaires et transiter dans le cytoplasme des cellules septales pour passer dans l'hémolymphe *via* la NKA située dans le système d'invaginations membranaires des cellules septales (McNamara et Torres, 1999). Chez les crevettes A et P, la forte immunofluorescence observée dans les cellules septales semble corroborer ce modèle. Aucune différence dans l'immunomarquage de la NKA n'a été

observée entre salinités chez les juvéniles des deux espèces. Cependant, la quantification des transcrits a mis en évidence un taux différentiel de transcrits de la NKA selon l'espèce, le stade de développement et la salinité. La différence du taux de transcrits de la NKA trouvée entre les deux espèces, semble corroborer les différences développementales et d'immunolocalisation de la NKA décrites dans l'article 1. La combinaison des résultats des trois approches (ontogenèse des organes osmorégulateurs, immunolocalisation et quantification de l'expression des osmoeffecteurs) nous fait suggérer que contrairement à *M. amazonicum*, *M. pantanalense* possède des branchies qui sont fonctionnelles dès les stades larvaires. On peut donc conclure que les deux espèces ont probablement deux mécanismes d'osmorégulation différents aux stades larvaires liés à leur différent mode de vie. Ceci n'est pas valable chez les juvéniles qui, quant à eux, vivent dans le même type d'habitat (ED) dans le milieu naturel. Nous émettons l'hypothèse que, chez les stades larvaires, *M. pantanalense* utilise la NKA présente dans les branchies pour créer un gradient électrochimique permettant l'absorption active de Na^+ en ED (en coopération avec la VHA, voir ci-dessous). Ceci est absent chez les mêmes stades larvaires (sauf la zoé 1) de *M. amazonicum*, ce qui ne lui permet pas d'effectuer l'intégralité de son cycle en ED. Dans ce cas, la NKA présente dans les branchiostégites serait suffisante pour créer un gradient électrochimique nécessaire à l'absorption des ions en eau saumâtre.

Chez plusieurs groupes d'organismes, il a été démontré que la pompe à protons V-type H^+ ATPase (VHA) connue pour son implication dans la régulation acido-basique peut également avoir un rôle dans les transports ioniques, surtout en ED. En position apicale, elle transporte des protons de la cellule vers le milieu externe, créant un gradient électrique qui facilite l'absorption de cations, en particulier le Na^+ , via des canaux spécifiques (Piermarini et Evans, 2001; Tsai et Lin, 2007; Huang et al., 2010; Lee et al., 2011). Chez les espèces *M. amazonicum* et *M. pantanalense*, la VHA a été localisée dans les cellules piliers des lamelles branchiales à la fois au niveau des microvillosités apicales et dans la partie cytoplasmique. Une localisation similaire de la VHA a été observée dans les cellules piliers des branchies du crabe *Eriocheir sinensis* (Putzenlechner, 1994), mais n'a jamais à notre connaissance été démontrée chez une crevette palaemonidae. Les présences conjointes de la VHA au niveau des microvillosités apicales et de mitochondries dans l'espace cytoplasmique sous-jacent mentionnées dans l'article 2 font penser à l'organisation des portosomes décrits chez les insectes. Ces portosomes ont été interprétés comme signe de transports ioniques actifs au niveau des membranes apicales.

Les résultats d'expression ont montré que le taux des transcrits de la VHA est plus élevé à faible salinité chez différents stades des deux espèces. Ceci indique que la VHA est probablement impliquée dans l'hyper-osmorégulation à faible salinité mais avec des degrés différents entre les deux espèces. Elle serait impliquée dès les jeunes stades larvaires de *M. pantanalense*, permettant ainsi une absorption ionique plus efficace et donc une meilleure adaptation aux faibles salinités. Chez *M. amazonicum*, cependant, son rôle dans l'hyper-osmorégulation à faible salinité ne se met en place qu'à partir du stade juvénile, ce qui est cohérent avec l'écologie de l'espèce qui se trouve en ED à partir de ce stade. De plus l'expression plus forte de la VHA chez les larves de *M. pantanalense* par rapport à *M. amazonicum* fournit une preuve supplémentaire que *M. pantanalense* est mieux équipée en terme de protéines osmorégulatrices nécessaires pour l'absorption d'ions, ce qui a permis le développement de ces larves dans des milieux de très faible salinité comme l'ED.

Le NHE est connu pour avoir des propriétés physiologiques différentes selon l'organisme (vertébré ou invertébré), pour sa stœchiométrie d'échange (électrogénique ou électroneutre) et sa localisation cellulaire (apicale ou basale). L'isoforme électrogénique transporte $2\text{Na}^+/\text{H}^+$, ce qui permet de créer une différence de potentiel membranaire. Les cations divalents comme le calcium se sont révélés être un substrat transporté par le NHE grâce à cette stœchiométrie à la place de deux ions monovalents de sodium (Ahearn et Franco, 1990 et 1993). De ce fait, un modèle a été proposé pour l'épithélium de l'hépatopancréas des crustacés reliant ce processus de transport à diverses activités biologiques comme l'acidification gastrique, l'absorption transcellulaire d'ions, et la régulation du calcium pendant le cycle de mue (Ahearn et al., 1994; Ahearn, 1996). Un système similaire de transport électrogénique a été décrit dans les branchies du crabe *Carcinus maenas* (Shetlar et Towle, 1989) où un emplacement apical (face au milieu externe) de cet échangeur a été proposé, colocalisé avec l'antiport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pour l'absorption de Cl^- (Towle, 1993). Un NHE électroneutre, probablement le NHE1, présentant une stœchiométrie de transport de $1\text{Na}^+/\text{H}^+$, a été caractérisé au niveau de la membrane basolatérale de l'hépatopancréas du homard. Les rôles attribués à cet échangeur sont la régulation du pH, du volume cellulaire et de la concentration en ions monovalents.

Chez *M. amazonicum*, la présence du NHE3 au niveau des cellules septales mais aussi au niveau des cellules piliers de certaines lamelles branchiales laisse suggérer que cet échangeur a probablement deux rôles différents chez cette espèce. D'après les travaux sur l'hépatopancréas et les branchies de crustacés, il est possible que le NHE3 que nous avons détecté au niveau des cellules septales soit électroneutre assurant la régulation acido-basique

des cellules, alors que celui détecté au niveau des cellules piliers serait électrogénique, et donc impliqué dans l'absorption de Na^+ nécessaire en hyper-osmorégulation à faible salinité. L'isoforme des cellules piliers pourrait également être impliquée dans d'autres fonctions physiologiques telles que la calcification de la cuticule au moment de la mue en absorbant du Ca^{2+} au lieu du Na^+ .

Le taux plus élevé de transcrits du NHE3 chez certains stades de développement et à certaines salinités chez *M. pantanalense* par rapport à *M. amazonicum* indique que cet échangeur a probablement un rôle dans l'osmorégulation chez l'espèce d'ED. Il n'est pas exclu que ces différences interspécifiques peuvent provenir d'une utilisation d'animaux à différents stades de mue entre les deux espèces, du fait du rôle du NHE dans l'absorption de Ca^{2+} .

L'ensemble de nos résultats, ainsi que les données bibliographiques concernant les mécanismes d'osmorégulation chez les organismes marins, nous permettent, au terme de ce travail de proposer un modèle au niveau des cellules des lamelles branchiales, des mécanismes régissant l'osmorégulation chez les juvéniles de *M. amazonicum* et *M. pantanalense* en milieu hypotonique (Fig. 8). Dans ce modèle, les transporteurs et les pompes ioniques sont séparées en deux compartiments structurellement distincts ; les cellules piliers et les cellules septales. Les deux forces motrices permettant l'absorption ionique en ED sont la NKA situé dans les invaginations membranaire des cellules septales, et la VHA situé dans la membrane apicale des cellules piliers (Boudour-Bouchecker et al., 2014). L'anydase carbonique (CA) des cellules piliers catalyse la réaction entre le CO_2 et l' H_2O et produit des H^+ et du HCO_3^- . Les protons sont excrétés vers le milieu externe grâce à l'activité de la VHA, ce qui crée un gradient électrique permettant une entrée de Na^+ via un canal à Na^+ (ENaC pour Epithelial Na^+ Channel). Une autre alternative pour une entrée apicale de Na^+ est l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3), permettant une sortie de H^+ et une entrée d'un ou deux ions Na^+ en fonction si cet échangeur est électrogénique ou électroneutre. Le Na^+ accumulée dans le cytoplasme des cellules piliers transite vers l'hémolymphe via des canaux à Na^+ . Le NHE3 des cellules septales pourrait participer à la régulation du pH et du volume cellulaire grâce au gradient électrochimique créé par la NKA qui transporte 3 ions Na^+ des cellules septales vers l'hémolymphe en échange de 2 ions K^+ . Quant aux ions chlorures, ils sont, d'après le modèle, transportés vers le cytoplasme des cellules piliers par l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en position apicale puis vers l'hémolymphe via un canal à Cl^- basal. Le rôle exact du NHE3 des cellules piliers et septales ainsi que la présence d'un canal à Na^+ du type ENaC et d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ chez les deux espèces de *Macrobrachium* restent à démontrer.

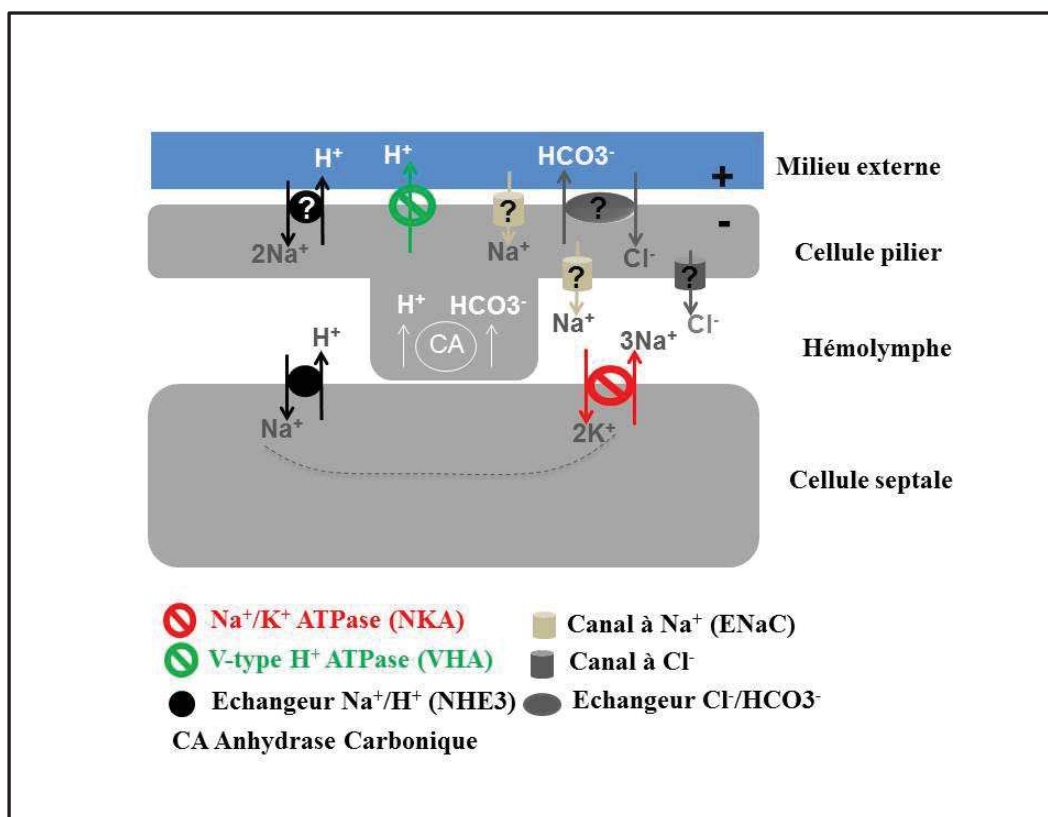


Fig. 8 : Schéma fonctionnel d'absorption ionique au niveau des cellules piliers et des cellules septales branchiales des juvéniles de *M. amazonicum* et *M. pantanalense*.

En conclusion, une différence majeure trouvée entre *M. amazonicum* et *M. pantanalense* est d'ordre développemental. Il est possible que la stratégie de développement plus rapide des branchies fonctionnelles chez *M. pantanalense* soit l'atout majeur qui lui a permis de survivre en eau douce dès l'éclosion, donc d'accomplir l'intégralité de son cycle dans ce milieu et ainsi de s'y établir et maintenir au cours de l'évolution, lorsque certains biotopes se sont trouvés privés de tout accès à des eaux salées. De plus, une différence fonctionnelle qui découle de la disparité développementale entre les deux espèces concerne les protéines osmorégulatrices (NKA, VHA, NHE3) qui sont plus exprimées chez les stades larvaires de *M. pantanalense*. Ces deux types de différences (en plus de la capacité de production d'une urine hypotonique démontrée chez les juvéniles des deux espèces et résultant de la réabsorption ionique au niveau des glandes antennaires) ont probablement permis l'acquisition de la fonction de l'hyper-osmorégulation par tous les stades larvaires de *M. pantanalense*. Par conséquent, ces larves n'ont plus besoin de l'eau salée pour survivre et se développer et donc *M. pantanalense* peut accomplir tout son cycle de vie en eau douce. La sélection opérant au cours des différentes générations a conduit à la perte de la fonction de l'hypo-osmorégulation en eau

salée qui ne sert plus à *M. pantanalense* contrairement à *M. amazonicum*, où cette fonction est encore indispensable pour le développement des larves en eau salée.

Notons enfin que les populations attribuées à *M. amazonicum* signalées dans le cours supérieur de l'Amazone et de ses affluents sont distantes de plusieurs milliers de kilomètres de l'estuaire. Il semble impossible que les adultes (femelles ovigères) d'une part et les juvéniles d'autre part puissent effectuer les migrations catadromes et anadromes qui caractérisent le cycle de *M. amazonicum*. Nous postulons donc que ces populations ont suivi une évolution comparable à celle de *M. pantanalense* lors de leur séparation au Pantanal, au moins sur le plan physiologique, avec l'aptitude à réaliser l'ensemble de leur cycle vital en eau douce. Cependant, contrairement à celles du Pantanal, ces populations ne sont pas strictement allopatriques par rapport à celles du cours inférieur de l'Amazone, du fait de la continuité du réseau hydrographique de l'Amazone. Des échanges géniques même réduits ont pu maintenir une homogénéité spécifique, à vérifier bien entendu.

Perspectives de recherche:

Dans le cadre de cette étude, nous n'avons abordé qu'une partie des processus physiologiques qui régissent l'osmorégulation chez les crevettes palaemonidae. Cependant, les résultats obtenus nous permettent d'envisager d'autres pistes, certaines hors du champ strict de la physiologie, à court et moyen terme, parmi lesquelles nous mentionnerons les suivantes :

Approfondir le rôle de la VHA et du NHE3 dans l'osmorégulation en ED: Dans un premier temps, il faudrait analyser la spécificité de l'anticorps utilisé pour localiser le NHE3 (d'origine humaine, rappelons-le) comme nous l'avons fait pour la VHA. Nous l'avons tenté au cours de ce travail mais nous n'avons pas obtenu de résultats probants, probablement à cause de la très faible quantité de cette protéine. Il faudra donc augmenter la taille des échantillons pour qu'elle soit détectable. Il faudra également localiser de manière plus précise le NHE3 au niveau des cellules de l'épithélium branchial, par une approche d'immunogold en microscopie électronique au niveau de l'épithélium branchial.

Dans cette étude nous avons montré la présence de la NKA, de la VHA et du NHE3 au niveau des cellules épithéliales des lamelles branchiales et des branchiostégites. Cependant la présence d'un transporteur n'implique pas forcément sa fonctionnalité. Des mesures de flux ioniques transépithéliaux en utilisant des microperfusions avec des inhibiteurs spécifiques des transporteurs ioniques sont nécessaires afin de confirmer le fonctionnement de tel ou tel transporteur selon la salinité d'exposition.

Nous avons également étudié l'expression de la NKA, de la VHA et du NHE3 au cours de l'ontogenèse, et en testant l'effet de la salinité. Cependant nous avons utilisé un temps d'acclimatation probablement trop court pour pouvoir tirer des conclusions définitives sur l'effet de la salinité sur l'expression de ces osmoeffecteurs, et donc de leur implication dans l'hyper ou l'hypo-osmorégulation. L'expérimentation pourra être améliorée sur deux points, d'une part, en associant les données géniques à des dosages de l'activité spécifique des enzymes (notamment la NKA et la VHA), et d'autre part en testant plusieurs temps d'acclimatation allant du court au moyen et long terme. Dans le premier cas, nous pourrions voir si la transcription et l'activité spécifique de l'enzyme sont liées et quel est le temps de réponse entre ces deux processus. Dans le deuxième cas, nous saurons si des modifications significatives de l'expression des transporteurs ont lieu sur le plus long terme. Bien évidemment, les résultats ne concerneront plus un stade donné (surtout pour les stades larvaires qui sont brefs) mais une partie de l'ontogenèse post-embryonnaire précoce.

Comme les larves de *M. pantanalense* sont aptes à osmoréguler dès l'éclosion, la question du moment d'acquisition de cette fonction se pose. Une étude associant l'ensemble des approches utilisées dans cette thèse peut donc s'envisager durant le développement embryonnaire.

La vérification de la fonctionnalité des gènes est également possible grâce à l'utilisation des techniques d'interférence par l'ARN, qui permettent d'inhiber de manière spécifique et transitoire l'expression d'un gène cible par injection d'ARN double-brins correspondants. Cette technique a été adaptée ces dernières années chez des crevettes pénéides et a permis de mettre en évidence le rôle fonctionnel de quelques gènes (Labreuche et al., 2010). Pour cela, des fragments d'ARN interférant sont introduits dans la cellule où ils s'apparient avec l'ARNm cible et le dégradent ou inhibent l'élongation de la traduction. L'application d'une telle technique permettrait de relier directement la fonctionnalité du gène à l'activité de la protéine transmembranaire pour laquelle il code, en soumettant les animaux auxquels on injecte de l'ARN interférant à des chocs osmotiques.

Montrer l'implication d'autres protéines osmorégulatrice chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense*: Il serait donc complémentaire d'étudier d'autres protéines osmorégulatrices qui sont impliquées dans l'absorption ou la sécrétion de Na^+ et/ou de Cl^- . Plusieurs modèles de mécanismes d'osmorégulation ont été proposés chez les crustacés (Towle et Weihrauch, 2001; Freire et al., 2008; Charmantier et al., 2009; McNamara et Faria, 2012) pour expliquer les voies d'absorption et de sécrétion des ions. La VHA et l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Evans et al., 2005; Genovese et al., 2005; Tresguerres et al., 2005; Tresguerres et al., 2006) sont connus pour intervenir dans la régulation ionique des animaux vivant en eau douce. Il a été proposé que ces deux transporteurs fonctionnent conjointement avec l'anhydrase carbonique qui fournirait au premier les ions H^+ et au second les ions HCO_3^- en échange d'ions Cl^- , jouant ainsi également un rôle dans la régulation acido-basique de la cellule. L'amiloride, inhibiteur du canal sodique ENaC (epithelial Na^+ channel), a montré la fonction de ce canal chez des espèces de crabes en empêchant le flux unidirectionnel du Na^+ (Kirschner, 2004), ce qui atteste de son rôle dans l'absorption du Na^+ . Il serait donc intéressant de caractériser ces deux osmoeffecteurs ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et ENaC), en utilisant tout d'abord l'immunofluorescence et l'immunogold pour établir leurs distributions tissulaires et cellulaires, puis en caractérisant les gènes codant ces protéines et en étudiant leur expression en fonction des variations de la salinité. Ceci devrait conduire à compléter le modèle fonctionnel d'ionocyte chez *M. amazonicum* et *M. pantanalense*, et ainsi participer à une meilleure compréhension des

mécanismes d'osmorégulation en situation d'hyper et d'hypo-régulation chez ces deux espèces.

Etudier les différentes protéines osmorégulatrices au cours de l'ontogenèse: La localisation des différents transporteurs transmembranaires pourrait être effectuée aux divers stades de développement comme cela a été fait pour la NKA. Par contre, cette étude devra être effectuée sur l'animal entier du fait de la petite taille des larves. Les résultats permettront sans doute de mieux interpréter les différences osmorégulatrices entre les stades larvaires des deux espèces.

Confirmer le rôle des glandes antennaires dans l'osmorégulation au cours de l'ontogenèse: la glande antennaire, grâce à la réabsorption ionique au niveau des tubules collecteurs, produit une urine hypotonique chez les juvéniles des deux espèces de *Macrobrachium* en eau douce. Cependant, afin de déterminer la chronologie de la mise en place de cette fonctionnalité, il est important d'avoir une approche ontogénétique. Il est possible que le développement des glandes antennaires chez les larves de *M. amazonicum* soit plus lent que chez *M. pantanalense*, ce qui l'empêcherait de produire une urine hypotonique à ces stades de développement, renforçant leur incapacité à vivre en ED. Le suivi histologique et ultrastructural du développement des glandes antennaires serait donc intéressant. De plus, soumettre les larves à des tests de chocs osmotiques permettrait de vérifier, par des mesures de pression osmotique de l'urine et de celle de l'hémolymphe, si elles sont capables de produire une urine hypotonique. Cette étude nécessiterait la mise au point de prélèvements d'urine chez les larves.

Une fois ces données physiologiques acquises, leurs dimensions comparatives et évolutives devraient révéler comment des traits spécifiques de l'osmorégulation ont surgi (l'hyper-osmorégulation) et d'autres traits ancestraux ont disparu (l'hypo-osmorégulation), donnant un aperçu de l'évolution de l'osmorégulation.

Etudier les populations du cours haut de l'Amazone: comme nous le disions plus haut, il est logique de penser que ces populations attribuées à *M. amazonicum* n'effectuent plus de migration vers des eaux salées. Des études sur le terrain permettraient d'une part de vérifier la présence de larves en ED. Des tests physiologiques pourraient montrer si, à l'instar de *M. pantanalense*, toutes les larves peuvent hyper-osmoréguler en ED, et si la fonction d'hypo-osmorégulation a également été perdue chez tous les stades y compris les adultes. L'ensemble

de ces traits pourrait probablement permettre de distinguer ces populations d'amont comme une ou des nouvelle(s) espèce(s) et de continuer à écrire l'histoire évolutive des *Macrobrachium* issues de l'Amazone.

**Liste des publications
et communications personnelles**

Liste des publications et communications personnelles

Publications de rang A dans des journaux référencés:

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Lorin-Nebel C., Elgero C., Grousset E., Anger K., Charmantier-Daures M., Charmantier G. (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell and Tissue Research*. 353: 87-98.

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Grousset E., Anger K., Charmantier G., Lorin-Nebel C. (2014). Differential distribution of V-H⁺ type ATPase and Na⁺/K⁺ ATPase in the branchial chamber of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell and Tissue Research*. 357: 195-206.

Publication en preparation:

Boudour-Bouchecker N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Anger K., Charmantier G., Lorin-Nebel C. Osmoregulation in two recently separated *Macrobrachium* species: Ion transporter expression patterns during ontogeny. À soumettre prochainement à *Journal of Comparative Physiology B*.

Congrès:

Boudour-Bouchecker N., Lorin-Nebel C., Boulo V., Anger K., Charmantier-Daures M., Charmantier G. Evolutionary transition to freshwater in the shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Changes in ontogeny of osmoregulation. Colloque d'EcoPhysiologie Animale (CEPA) (Lyon, Novembre 2013).

Boudour-Bouchecker N., Lorin-Nebel C., Boulo V., Anger K., Charmantier-Daures M., Charmantier G. Evolutionary transition to freshwater in the shrimp *Macrobrachium amazonicum*: Changes in osmoregulatory organs, cells and transporters. Annual meeting, The Society for Experimental Biology (SEB) (Manchester, Juillet 2014).

Boudour-Bouchecker N., Lorin-Nebel C., Boulo V., Anger K., Charmantier G., Charmantier-Daures M. Ontogeny of osmoregulatory organs in two closely related species of *Macrobrachium* with different life histories. 8th International Crustacean Congress (ICC8) (Francfort, Août 2014).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahearn, G.A. et A. Tornquist** (1977). Allosteric cooperativity during intestinal cotransport of sodium and chloride in freshwater prawns. *Biochemica and Biophysica Acta* 471: 273-279.
- Ahearn, G.A., L.A. Maginniss, Y.K. Song et A. Tornquist** (1977). Intestinal water and ion transport in fresh-water malacostracan prawns (Crustacea). In: *Water relations in membrane transport in plants and animals*. Jungreis A., Hidges T., Kleinzeller A. and S. Schultz (Eds). Academic Press, New York, 129-142.
- Ahearn, G.A.** (1978). Allosteric cotransport of sodium chloride and calcium by the intestine of freshwater prawns. *Journal of Membrane Biology* 42: 281-300.
- Ahearn, G.A.** (1980). Intestinal electrophysiology and trans-mural ion transport in freshwater prawns. *American Journal of Physiology* 239: 1-10.
- Ahearn, G.A. et L.P. Clay** (1989). Kinetic analysis of electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiport in crustacean hepatopancreas. *American Journal of Physiology* 257: 484-493.
- Ahearn, G.A. et P. Franco** (1990). Na^+ and Ca^{2+} share the electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter in crustacean antennal glands. *American Journal of Physiology* 259: 759-767.
- Ahearn, G.A., P. Franco et L.P. Clay** (1990). Electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchange in crustaceans. *Journal of Membrane Biology* 116: 215-226.
- Ahearn, G.A. et P. Franco** (1993). Ca transport pathways in brush border membrane vesicles of crustacean antennal glands. *American Journal of Physiology* 264: 1206-1213.
- Ahearn, G.A., Z. Zhuang, J. Duerr et V. Pennington** (1994). Role of the invertebrate electrogenic $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter in monovalent and divalent cation transport. *The Journal of Experimental Biology* 196: 319-336.
- Ahearn G.A. et Z. Zhuang** (1996). Cellular mechanisms of calcium transport in crustaceans. *Physiological Zoology* 69: 383-402.
- Almelkar, G.B., S. Shenoy, D.R. Jalihal et K.N. Sankolli** (2000). Prolonged larval development of an inland palaemonid prawn *Macrobrachium walvanensis* from India. In: *The biodiversity crisis and Crustacea*. Von Vaupel Klein J.C. and Schram F.R. (Eds). Balkema A.A., Rotterdam, Brookfield, 593-598.
- Anger, K. et G.S. Moreira** (1998). Morphometric and reproductive traits of tropical Caridean shrimps. *Journal of crustacean biology* 18: 823-838.
- Anger, K.** (2001). The biology of decapod crustacean larvae. *Crustacean Issues* 14. Balkema A.A., Lisse, The Netherlands, pp 420.

- Anger, K., G.S. Moreira et D. Ismael** (2002). Comparative size, biomass, elemental composition (C, N, H), and energy concentration of caridean shrimp eggs. *Invertebrate Reproduction and Development* 42: 83-93.
- Anger, K.** (2003). Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 43: 29-45.
- Anger, K., G. Torres et U. Nettelmann** (2007). Adaptive traits in ecology, reproduction and early life history of *Sesarma meridies*, an endemic stream crab from Jamaica. *Marine and Freshwater Research* 58: 743-755.
- Anger, K., L. Hayd, J. Knott et U. Nettelmann** (2009). Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture* 287: 341-348.
- Anger, K. et L. Hayd** (2010). Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquatic Biology* 9: 251-261.
- Anger, K.** (2013). Neotropical *Macrobrachium* (caridea: palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* 33: 151-183.
- Augusto, A., L.J. Greene, H.J. Laure et J.C. Mcnamara** (2007). The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 27: 626-634.
- Augusto, A., P.A. Silva, L.J. Greene, H.J. Laure et J.C. Mcnamara** (2009). Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine Palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* 7: 113-122.
- Avenet, P. et J.M. Lignon** (1985). Ionic permeabilities of the gill lamina cuticle of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Journal of Physiology* 363: 377-401.
- Baldwin, J.F. et L.B. Kirschner** (1976). Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 75% sea water. *Physiological Zoology* 49: 158-171.
- Barra, J.A., A. Péqueux et W. Humbert** (1983). A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue Cell* 15: 583-596.
- Barradas, C., S. Dunel-Erb, J. Lignon et A. Péqueux** (1999). Superimposed morphofunctional study of ion regulation and respiration in single gill filaments of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Crustacean Biology* 19: 14-25.
- Bate, C.S.** (1868). On a new genus, with four new species, of freshwater prawns. *Proceedings of the Zoological Society of London*: 363-368.
- Bauer, R.T.** (2004). Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. University of Oklahoma Press, Norman, pp 289.

- Belli, N.M., R.O. Faleiros, K.C.S. Firmino, D.C. Masui, F.A. Leone, J.C. McNamara et R.P.M. Furriel** (2009). Na^+/K^+ ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 152: 431-439.
- Benzie, J.A.H.** (1982). The complete larval development of *Caridina mccullochi* Roux, 1926 (Decapoda, Atyidae) reared in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology* 2: 493-513.
- Benzie, J.A.H. et P.K. De Silva** (1983). The abbreviated larval development of *Caridina singhalensis* Ortmann, 1894 (Decapoda, Atyidae). *Journal of Crustacean Biology* 3: 117-126.
- Beyenbach, K.** (2001). Energizing epithelial transport with the vacuolar H^+ ATPase. *News in Physiological Sciences* 16: 145-151.
- Beyenbach, K. et H. Wiczorek** (2006). The V-type H^+ -ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 577-589.
- Bialecki, A., K. Nakatani, G. Baumgartner et G. Bond Buckup** (1997). Occurrence of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae) in Leopoldo's Inlet (Ressaco do Leopoldo), upper Parana River, Porto Rico, Parana. *Revista Brasileira de Zoologia* 14: 379-390.
- Bianchini, A. et C.M. Wood** (2008). Sodium uptake in different life stages of crustaceans: the water flea *Daphnia magna* Strauss. *The Journal of Experimental Biology* 211: 539-547.
- Bouaricha, N., M. Charmantier-Daures, P. Thuet, J.P. Trilles et G. Charmantier** (1994). Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Biological Bulletin* 186: 29-40.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo V., Lorin-Nebel C., Elgero C., Grousset E., Anger K., Charmantier-Daures M. et G. Charmantier** (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell and Tissue Research*. 353: 87-98.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo V., Charmantier-Daures M., Grousset E., Anger K., Charmantier G. et C. Lorin-Nebel** (2014). Differential distribution of V- H^+ type ATPase and Na^+/K^+ ATPase in the branchial chamber of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell and Tissue Research*. 357: 195-206.
- Brett, C.L., Donowitz M. et R. Rao** (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 288: 223-239.
- Brodie, D.A. et K. Halcrow** (1978). Hemolymph regulation to hyposaline and hypersaline conditions in *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda), *Experientia* 34: 1297-1298.

- Bückle, L.F., B. Barón et M. Hernández** (2006). Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de Biología tropical* 54: 745-753.
- Burnett, L.E., T.N. Dunn et R.L. Infantino** (1985). The function of carbonic anhydrase in crustacean gills. In: Transport processes, ionic and osmoregulation. Gilles R. and Gilles-Baillien M. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 159-168.
- Burnett, L.E. et D.W. Towle** (1990). Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: Effects of ouabain and amiloride. *Journal of Experimental Biology* 149: 293-305.
- Carvalho, T.P. et J.S. Albert** (2011). The Amazon-Paraguay divide. In: Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Albert J.S. and Reis R.E. (Eds). The Regents of the University of California, 93-202.
- Castilho, P.C., I.A. Martins et A. Bianchini** (2001). Gill Na^+/K^+ ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 256: 215-227.
- Castille, F. et A.L. Lawrence** (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium, and chloride concentrations in the hemolymph of the freshwater shrimps, *Macrobrachium ohione* smith and *Macrobrachium rosenbergii* de Mann. *Comparative Biochemistry and Physiology* 70: 47-52.
- Charmantier, G.** (1980). Etude écophysiologique des crustacés isopodes gnathiidae: osmorégulation et résistance à la dessiccation des mâles de *Paragnathia formica* (Hesse, 1864). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 43: 161-171.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures et D.E. Aiken** (1984). Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the American lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards, 1937 (Crustacea, Decapoda): 1. Juveniles. *General and Comparative Endocrinology* 54: 8-19.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures et D.E. Aiken** (1991). Metamorphosis in the lobster *Homarus* (Decapoda): a review. *Journal of Crustacean Biology* 11: 481-495.
- Charmantier-Daures, M., P. Thuet, G. Charmantier et J.P. Trilles** (1988). Tolérance à la salinité et osmorégulation chez les post-larves de *Penaeus japonicus* et *P. chinensis*. Effet de la température. *Aquatic Living Resources* 1: 267-276.
- Charmantier, G.** (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 177-190.
- Charmantier, G. et M. Charmantier-Daures** (2001). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: the embryonic phase. *American Zoologist* 41: 1078-1089.

- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures et D.W. Towle** (2009). Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. Evans DH (Ed). Taylor & Francis Group, London, 165-208.
- Charmantier, G. et K. Anger** (2011). Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hyporegulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396: 89-98.
- Chen, R.T., C.F. Tsai et W.N. Tzeng** (2009). Freshwater prawns (*Macrobrachium* Bate, 1868) of Taiwan with special references to their biogeographical origins and dispersion routes. *Journal of Crustacean Biology* 29: 232-244.
- Chung, K.F. et H.C. Lin** (2006). Osmoregulation and Na^+/K^+ ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144: 48-57.
- Cieluch, U., K. Anger, F. Aujoulat, F. Buchholz, M. Charmantier-Daures et G. Charmantier** (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *The Journal of Experimental Biology* 207: 325-336.
- Cieluch, U., G. Charmantier, E. Grousset, M. Charmantier-Daures et K. Anger** (2005). Osmoregulation, immunolocalization of Na^+/K^+ ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiological and Biochemical Zoology* 78: 1017-1025.
- Claiborne, J.B.** (1998). Acid-base regulation. In: *The physiology of fishes*. Evans D.H. (Ed) Boca Raton, CRC Press, 177-198.
- Compère, P., S. Wanson, A. Péqueux, R. Gilles et G. Goffinet** (1989). Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* 21: 229-318.
- Copeland, D.E.** (1968). Fine structure of salt and water uptake in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *American Zoologist* 8: 417-432.
- Copeland, D.E. et A.T. Fitzjarrell** (1968). The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 92: 1-22.
- Corotto, F.S. et C.W. Holliday** (1996). Branchial Na^+/K^+ ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comparative Biochemistry and Physiology* 113: 361-368.

- Covi, J.A. et S.C. Hand** (2005). V-ATPase expression during development of *Artemia franciscana* embryos: potential role for proton gradients in anoxia signaling. *Journal of Experimental Biology* 208: 2783-2798.
- Croghan, P.C.** (1958). The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina*. *Journal of Experimental Biology* 35: 219-233.
- Dall, W.** (1967). Hypo-osmoregulation in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 21: 653- 678.
- De Grave, S., Y. Cai et A. Anker** (2008). Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 287-293.
- De Grave, S., N.D. Pentcheff, S.T. Ah Yong, T.Y. Chan, K.A. Crandall, P.C. Dworschak, D.L. Felder, R.M. Feldmann, C. Franssen, L.Y.D. Goulding, R. Lemaitre, M.E.Y. Low, J.W. Martin, P.K.L. Ng, C.E. Schweitzer, S.H. Tan, D. Tshudy et R. Wetzer** (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology Supplement* 21: 1-109.
- De Renzis, G. et M. Bornancin** (1984). Ion transport and gill ATPases. In: *Fish physiology gills*. Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds). X.B. Academic, Orlando, 65-104.
- Dobkin, S.** (1969). Abbreviated larval development in caridean shrimps and its significance in the artificial culture of these animals. *FAO Fisheries Reports* 57: 935-945.
- dos Santos, A., L. Hayd et K. Anger** (2013). A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa* 3700: 534-546.
- Duerr, J.M. et G.A. Ahearn** (1996). Characterization of a basolateral electroneutral Na^+/H^+ antiporter in Atlantic lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic epithelial vesicles. *The Journal of Experimental Biology* 199: 643-651.
- Ehrenfeld, J., I. Lacoste, F. Garcia-Romeu et B.J. Harvey** (1990). Inter dependence of Na^+ and H^+ transport in frog skin. In: *Animal nutrition and transport processes*. Truchot J.P. and Lahlou B. (Eds). Karger, Basel, vol 6: 152-170.
- Evans, D.H., P.M. Piermarini et K.P. Choe** (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85: 97-177.
- Evans, D.H.** (2008). Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295: 704-713.

- Evans, D.H. et J.B. Claiborne** (2009). Osmotic and ionic regulation in fishes. In: Osmotic and Ionic Regulation. Cells and Animals. Evans D.H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 295-366.
- Espurt, N., P. Baby, S. Brusset, M. Roddaz, W. Hermoza, V. Regard, P.O. Antoine, R. Salas-Gismondi et R. Bolanos** (2007). How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin? *Geology* 35: 515-518.
- Faleiros, R.O., M.H.S. Goldman, R.P.M. Furriel et J.C. McNamara** (2010). Differential adjustment in gill Na^+/K^+ and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology* 213: 3894-3905.
- Farmer, L.** (1980). Evidence for hyporegulation in the calanoid copepod *Acartiatonsa*, *Comparative Biochemistry and Physiology A* 65: 359-362.
- Feldmann, R. M. et C.E. Schweitzer** (2006). Paleobiogeography of southern hemisphere decapod Crustacea. *Journal of Paleontology* 80: 83-103.
- Firmino, K.C.S., R. Faleiros, D.C. Masui, J.C. McNamara R.P.M Furriel** (2011). Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 160: 24-31.
- Flik, G. et C. Haond** (2000). Na^+ and Ca^{2+} pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute seawater. *The Journal of Experimental Biology* 203: 213-220.
- Forgac, M.** (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPases. *FEBS letters* 258-263.
- França, J.L., M.R. Pinto, M.N. Lucena, D.P. Garçon, W.C. Valenti, J.C. McNamara et F.A. Leone** (2013). Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na^+,K^+) ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Membrane Biology* 246: 529-543.
- Freire, C.A. et J.C. McNamara** (1995). Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *Journal of Crustacean Biology* 15: 103-116.
- Freire, C.A., F. Cavassin, E.N. Rodrigues, A.H. Torres et J.C. McNamara** (2003). Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology: Molecular and Integrative Physiology* 136: 771-778.

- Freire, C.A., H. Onken et J.C. McNamara** (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 151: 272-304.
- Fuller, E.G., G.J. Highison, F. Brown et C. Bayer** (1989). Ultrastructure of the crayfish antennal gland revealed by scanning and transmission electron microscopy combined with ultrasonic microdissection. *Journal of Morphology* 200: 9-15.
- Furriel, R.P.M., Firmino, K.C.S., Masui, D.C., Faleiros, R.O., Torres, A.H. et J.C. McNamara** (2010). Structural and biochemical correlates of Na, K-ATPase driven ion uptake across the posterior gill epithelium of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *Journal of Experimental Zoology* 313: 508-523.
- García-Dávila, C.R. et C. Magalhães** (2004). Revisão taxonômica dos camarões de água doce (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae, Sergestidae) da Amazônia Peruana. *Acta Amazonica* 33: 663-686.
- Geddes, M.C.** (1975). Studies on an Australian brine shrimp *Parartemia zietziana* Sayce (Crustacea, Anostraca). III. The mechanisms of osmotic and ionic regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 51: 573-578.
- Genovese, G., N. Ortiz, M.R. Urcola C.M. Luquet** (2005). Possible role of carbonic anhydrase, V-(H⁺)-ATPase, and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142: 362-369.
- Gilles, R. et A. Péqueux** (1983). Interactions of chemical and osmotic regulation with the environment. In: *Environmental Adaptations*. Vernberg F. and Vernberg W.B. (Eds). Academic Press, New York, 109-177.
- Gilles, R. et A. Péqueux** (1985). Ion transport in crustacean gills: physiological and ultrastructural approaches. In: *Transport processes, ionic and osmoregulation*. Gilles R. and Gilles-Baillien M. (Eds). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, 136-158.
- Glor, R.E.** (2010). Phylogenetic insights on adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 251-270.
- Green, J. W., H. Harsch, L. Barr et C.L. Prosser** (1959). The regulation of water and salt by the fiddler crabs *Uca pugnax* and *Uca pugilator*. *Biological Bulletin* 116: 76-87.
- Greenaway, P.** (1985). Calcium balance and moulting in the Crustacea. *Biological Reviews* 60: 425-454.
- Gross, W.J.** (1957). An analysis of response to osmotic stress in selected decapod Crustacea, *The Biological Bulletin*. 112: 43-62.

- Guest, W.C.** (1979). Laboratory life history of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 37: 141-152
- Haond, C., G. Flik, et G. Charmantier** (1998). Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. *The Journal of Experimental Biology* 201: 1817-1833.
- Hardy, C., J. Munro et J.D. Dutil** (1994). Temperature and salinity tolerance of the soft-shell and hard-shell male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Aquaculture* 122: 249-265.
- Harris R.R. et M.C.F. Santos** (1993). Ionoregulatory and urinary responses to emersion in the mangrove crab *Ucides cordatus* and the intertidal crab *Carcinus maenas*. *Journal of Comparative Physiology* 163: 18-27.
- Harvey, W.R., M. Cioffi et M.G. Wolfersberger** (1981). Portasomes as coupling factors in active ion transport and oxidative phosphorylation. *American Zoologist* 21: 775-791.
- Harvey, B.J.** (1992). Energization of sodium absorption by the H⁺-ATPase pump in mitochondria-rich cells of frog skin. *The Journal of Experimental Biology* 172: 289-309.
- Heeg, J. et J. Cannone** (1966). Osmoregulation by means of a hitherto unsuspected osmoregulatory organ in two grapsid crabs, *Zoologica Africana*, 2: 127-129.
- Henry, R.P. et M.G. Wheatly** (1992). Interaction of respiration, ion regulation and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *American Zoologist* 32: 407-416.
- Henry, R.P., E.E. Garrelts, M.M. McCarty et D.W. Towle** (2002). Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *Journal of Experimental Zoology* 292: 595-603.
- Hiroi, J.** (2005). Chloride turnover and ion-transporting activities of yolk-sac preparations (yolk balls) separated from Mozambique tilapia embryos and incubated in freshwater and seawater. *Journal of Experimental Biology* 20: 3851-3858.
- Holthuis, L. B.** (1951). The caridean crustacea of tropical West Africa. *Atlantide Report* 2: 1-187.
- Holthuis, L.B.** (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. Allan Hancock Foundation Publications Occasional Papers 12: 1-396.
- Holliday, C.W.** (1980). Magnesium transport by the urinary bladder of the crab *Cancer magister*. *The Journal of Experimental Biology* 86: 187-201.
- Hoorn, C., H. Terstege, M.A. Bermudez, A. Mora, J. Sevink, I. Sanmartín, A. Sanchez-Meseguer, C.L. Anderson, J.P. Figueiredo, C. Jaramillo, D. Riff, F.R. Negri, H. Hooghiemstra, J. Lundberg, T. Stadler, T. Särkinen et A. Antonelli** (2010). Amazonia

through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927-931.

Huang, C.Y., P.L. Chao et H.C. Lin (2010). Na^+/K^+ ATPase and vacuolar-type H^+ -ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 155: 309-318.

Hubert, N. et J.F. Renno (2006). Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33: 1414-1436.

Hunte, W. (1980). The larval development of the shrimp *Macrobrachium faustinum* reared at the laboratory. *Caribbean Journal of Science* 15: 49-68.

Huong, D.T.T., V. Jayasankar, S. Jasmani, H. Saido-Sakanaka, A.J. Wigginton et M.N. Wilder (2004). Na^+/K^+ ATPase activity during larval development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of salinity on survival rates. *Fisheries Science* 70: 518-520.

Huong, D.T.T., T. Wang., M. Bayley et N.T. Phuong (2010). Osmoregulation, growth and moulting cycles of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) at different salinities. *Aquaculture Research* 41: 135-143.

Ibaraki, M. (1997). Closing of the Central American seaway and neogene coastal upwelling along the Pacific coast of South America. *Tectonophysics* 281: 99-104.

Jalihal, D.R., K.N. Sankolli et S. Shenoy (1993). Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 65: 365-376.

Jayachandran, K.V. (2001). Palaemonid prawns: biodiversity, taxonomy, biology and management. Science Publishers, Enfield, pp 624.

Jones, L.L. (1941). Osmotic regulation in several crabs of the Pacific coast of North America. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 18: 79-92.

Khodabandeh, S., G. Charmantier, C. Blasco, E. Grousset et M. Charmantier-Daures (2005a), Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. *Cell and Tissue Research* 319: 153-165.

Khodabandeh, S., G. Charmantier et M. Charmantier-Daures (2005b), Ultrastructural studies and $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53: 1203-1214.

Kirby, M.X., D.S. Jones et B.J. Macfadden (2008). Lower miocene stratigraphy along the Panama Canal and its bearing on the Central American Peninsula. *Plos One* 3: e2791.

- Kirschner, L.B.** (1979). Control mechanisms in crustaceans and fishes. In: Mechanisms of osmoregulation in animals. Gilles R. (Ed.). Wiley Interscience, New York, 157-222.
- Kirschner, L.B.** (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyper regulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology* 207: 1439-1452.
- Krogh, A.** (1938). The active absorption of ions in some freshwater animals. *Vergleich Physiologie* 25: 335-350.
- Labreuche, Y., A. Veloso, E. de la Vega, P.S. Gross, R.W. Chapman, C.L. Browdy et G.W. Warr** (2010). Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the acific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology* 34: 1209-1218.
- Lee, C.E. et M.A. Bell** (1999). Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 284-288.
- Lee, C.E., M. Kiergaard, G.W. Gelembiuk, B.D. Eads et M. Posavi** (2011). Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65: 2229-2244.
- Lemaire, P., E. Bernard, J.A. Martinez-Paz et L. Chim** (2002). Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub-adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209: 307-317.
- Lessios, H.A.** (2008). The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 63-91.
- Lignon, J.M.** (1987). Structure and permeability of the decapod crustacean cuticle. In: *Comparative Physiology of Environmental Adaptation, Adaptation to Salinity and Dehydration*. Kirsch R. and Lalhou B. (Eds), Karger, Basel, Vol. 1:178-187.
- Lignon, J.M., A. Péqueux et J.P. Gendner** (1988). Perméabilité cuticulaire branchiale aux ions chez les Crustacés Décapodes et salinité du milieu environnant. *Océanis* 14: 487-503.
- Lignon, J.M. et A. Péqueux** (1990). Permeability properties of the cuticle and gill ion exchanges in decapod crustaceans. In: *Animal Nutrition and Transport Processes. Transport, Respiration and Excretion: Comparative and Environmental Aspects*. Truchot J.P. and Lalhou B. (Eds). Karger, Basel, Vol. 2:14-27.
- Lignot, J.H., M. Charmantier-Daures et G. Charmantier** (1999). Immuno-localization of Na⁺/K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Research* 296: 417-426.

- Lignot, J.H., C. Spanings-Pierrot et G. Charmantier** (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans, *Aquaculture* 191: 209-245.
- Lignot, J.H. et G. Charmantier** (2001). Immunolocalization of Na^+/K^+ ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49: 1013-1023.
- Lignot, J.H., G.N., Susanto, M. Charmantier-Daures et G. Charmantier** (2005). Immunolocalization of Na^+/K^+ -ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell and Tissue Research* 319: 331-339.
- Lovejoy, N.R., J.S. Albert et W.G.R. Crampton** (2006). Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: evidence from neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences* 21: 5-13.
- Lovett, D.L., T. Colella, A.C. Cannon, H. Lee, A. Evangelisto, E.M. Muller et D.W. Towle** (2006). Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biology Bulletin* 210: 132-139.
- Lucu, C. et D. Siebers** (1986). Amiloride-sensitive sodium flux and potentials in perfused *Carcinus* gill: preparations. *Journal of experimental biology* 122: 25-35.
- Lucu, C.** (1990). Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97: 267-306.
- Lucu, C.** (1993). Ion transport in the gill epithelium of aquatic Crustacea. *Journal of Experimental Zoology* 265: 378-386.
- Lucu, C. et D.W. Towle** (2003). Na^+/K^+ ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 195-214.
- Luquet, C.M., D. Weihrauch, M. Senek et D.W. Towle** (2005). Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *The Journal of Experimental Biology* 208: 3627-3636.
- Maina, J.N.** (1990). The morphology of the gills of the freshwater African crab *Potamonniloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamonidae): a scanning and transmission electron microscope study. *Journal of Zoology London* 221: 499-515.
- Maciel, C. R. et W. C. Valenti** (2009). Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius* 17: 61-79.
- Magalhães, C.** (1985). Desenvolvimento larval obtidoem laboratório de palaemonídeos da Região Amazonica. *I. Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea, Decapoda). *Amazoniana-Limnologia Et Oecologia Regionalis Systemae Fluminis Amazonas* 9: 247-274.

- Magalhães, C. et I. Walker** (1988). Larval development and ecological distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). *Crustaceana* 55: 279-292
- Magalhães, C. et N. Medeiros** (1998). The larval development of palaemonid shrimps from the Amazon region reared in the laboratory. VII. Abbreviated development of *Pseudopalaemon amazonensis* Ramos-Porto, 1979 (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Acta Amazonica* 28: 433-448
- Magalhães, C.** (2000 a). Abbreviated larval development of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from the Rio Solimões floodplain, Brazil, reared in the laboratory. *Nauplius* 8: 1-14.
- Magalhães, C.** (2000 b). Diversity and abundance of decapod crustaceans in the Rio Negro Basin, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. (Appendix 285: descriptions of crustacean species collected from the Pantanal). In: A biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. Willink P., Chernoff B., Alonso L.E., Montambault J. and Lourival R. (Eds). Conservation International, Washington D.C., 56-62.
- Magalhães, C., S.L.S. Bueno, G. Bond-Buckup, W.C. Valenti, H.L. M. Da Silva, F. Kiyohara, E.C. Mossolin et S.S. Rocha** (2005). Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. *Biodiversity and Conservation* 14: 1929-1945.
- Magalhães, C. et G.A. Pereira** (2007). Assessment of the decapod crustacean diversity in the Guayana Shield region aiming at conservation decisions. *Biota Neotropica* 7: 1-14.
- Mantel, L.H.** (1968). The foregut of *Gecarcinus lateralis* as an organ of salt and water balance. *American Zoologist* 8: 433-442.
- Mantel, L.H. et L.L. Farmer** (1983). Osmotic and ionic regulation. In: The biology of Crustacea. Mantel L.H. (Ed.). Academic Press, New York, 53-161.
- Martinez, A.S., G. Charmantier, P. Compère et M. Charmantier-Daures** (2005). Branchial chambers ionocytes in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue and Cell* 37: 153-165.
- Mashiko, K.** (1999). Polypatric evolution of egg size among local populations of the palaemonid prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849) during colonization of inland waters. In: Crustaceans and the biodiversity crisis. Schram F.R. and Von Vaupel Klein J.C. (Eds). Koninklijke Brill N.V., Leiden, The Netherlands, Vol. 1:527-532.
- Masui, D.C., R.P.M. Furriel, F.L.M. Mantelatto, J.C. McNamara et F.A. Leone** (2005). K⁺-phosphatase activity of gill (Na⁺,K⁺) ATPase from the blue crab, *Callinectes sapidus* danae: low-salinity acclimatation and expression of the subunit. *Journal of Experimental Zoology* 303: 294-307.

- McNamara, J.C.** (1987). The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107: 245-251.
- McNamara, J.C. et A.G. Lima** (1997). The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biological Bulletin Marine Biology Laboratory Woods Hole* 192: 321-331.
- McNamara, J.C. et A.H. Torres** (1999). Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology* 284: 617-628.
- McNamara, J.C. et S.C. Faria** (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology* 182: 997-1014.
- Montoya, J.V.** (2003). Freshwater shrimps of the genus *Macrobrachium* associated with roots of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). *Caribbean Journal of Science* 39: 155-159.
- Murphy, N.P. et C.M. Austin** (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta* 34: 187-197.
- Nelson, N., W. Harvey** (1999). Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosine triphosphatases. *Physiological Reviews* 79: 361-385.
- Neufeld, G.J., C.W. Holliday et J.B. Pritchard** (1980). Salinity adaption of gill Na^+/K^+ ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology* 211: 215-224.
- Ng, P.K.L., D. Guinot. et P. J. F. Davie** (2008). Systema Brachyurorum. Part 1. An annotated check list of extant Brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement* 17: 1-286.
- Norfolk, J.R.W.** (1978). Internal volume and pressure regulation in *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology* 74: 123-132.
- Odinetz-Collart, O.** (1991). Stratégie de reproduction de *Macrobrachium amazonicum* en Amazonie Centrale (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Crustaceana* 61: 253-270.
- Odinetz-Collart, O. et H. Rabelo** (1996). Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 16: 684-688.

- Onken, H. et M. Putzenlechner** (1995). A V-ATPase drives active, electrogenic and Na^+ independent Cl^- absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. The Journal of Experimental Biology 198: 767-77.
- Onken, H. et S. Riestenpatt** (1998). NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. Comparative Biochemistry and Physiology 119: 883-893.
- Pantaleão, J.A.F., G.L. Hirose et R.C. da Costa** (2012). Relative growth, morphological sexual maturity, and size of *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) in a population with an entirely freshwater life cycle. Invertebrate Reproduction and Development 56: 180-190.
- Peterson, D.R. et R.F. Loizzi** (1974). Ultrastructure of the crayfish kidney, coelomosac, labyrinth, and nephridial canal. Journal of Morphology 142: 241-264.
- Peterson, D.R. et R.F. Loizzi** (1975). Biochemical and cytochemical investigation of Na^+, K^+ ATPase in the crayfish kidney. Comparative Biochemistry and Physiology 49: 763-773.
- Piermarini P.M. et D.H. Evans** (2001). Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na^+/K^+ -ATPase. The Journal of Experimental Biology 204: 3251-3259.
- Pierrot, C.** (1994). Physiologie branchiale et osmorégulation chez *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacé, Décapode), Doctorat, Université de Montpellier II.
- Péqueux, A.** (1995). Osmotic regulation in crustaceans. Journal of Crustacean Biology 15: 1-60.
- Pereira, G.A.** (1997). A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). Acta Biológica Venezuelica 17 (Supplement): 1-69.
- Prosser, C.L., J.W. Green et T.J. Chow** (1955). Ionic and osmotic concentration in blood and urine of *Pachygrapsus crassipes* acclimated to different salinities. The Biological Bulletin 109: 99-107.
- Putzenlechner, M.** (1994). Charakterisierung und Lokalisation einer Protonen-ATPase des V-typs in den Kiemen dekapoder Krebse (Crustacea, Dekapoda). PhD thesis, Freien Universität, Berlin.
- Rabalais, N.N. et R.H. Gore** (1985). Abbreviated development in Decapods. In: Larval growth. Wenner A. M. (Ed.). Balkema, Rotterdam, 67-126.
- Rasalan, S.B., M.N. Delmendo et T.G. Reyes** (1969). Some observations on the biology of the freshwater prawn *Macrobrachium lanceifrons* (Dana), with notes on the fishery. FAO Fisheries Reports 57: 923-933.

- Riestenpatt, S., G. Petrausch et D.Siebers** (1995). Cl^- influx across posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*): potential energization by a V-type H^+ ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110: 235-241.
- Robe, L.J., S. Machado et M.L. Bartholomei-Santos** (2012). The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). *Zoological Science* 29: 714-724
- Rome, N.E., S.L. Conner et R.T. Bauer** (2009). Delivery of hatching larvae to estuaries by an amphidromous river shrimp: tests of hypotheses based on larval moulting and distribution. *Freshwater Biology* 54: 1924-1932.
- Schluter, D.** (2000). The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press, Oxford, pp 296.
- Sesma, P., C. Bayona, A.C. Villaro et J.J. Vazquez** (1983). A microscopic study on the antennal gland of *Antrapotamobius ballines* (Crustacea, Decapoda), *Morfologia Normal y Patologica*, 7: 289-301.
- Shetlar R.E. et D.W. Towle** (1989). Electrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. *American Journal of Physiology* 257: 924-931.
- Shy, J.Y., H.T. Lai et H.P. Yu** (2001). On the larval development of *Caridina formosae* (Decapoda, Atyidae) reared in the laboratory. *Crustaceana* 74: 1159-1168.
- Siebers, D., K. Leweck, H. Markus et A. Winkler** (1982). Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Marine Biology* 69: 37-43.
- Spaargaren, D.H.** (1974). A study on the adaptation of marine organisms to changing salinities with special reference to the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 47: 499-512.
- Talbot, P., W.H. Clark et A.L. Lawrence** (1972). Light and electron microscopic studies on osmoregulatory tissue in the developing brown shrimp, *Penaeus aztecus*, *Tissue Cell* 4: 271-286.
- Taylor, H.H. et E.W. Taylor** (1992). Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Harrison F.W. and Humes A.G. (Eds). Wiley-Liss, New York, 203-343.
- Torres, G., M. Charmantier-Daures, S. Chifflet et K. Anger** (2007). Effects of long term exposure to different salinities on the location and activity of Na^+ - K^+ -ATPase in the gills of juvenile mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147: 460-465.

- Torsvik, T.H., S. Rousse, C. Labails et M.A. Smethurst** (2009). A new scheme for the opening of the South Atlantic Ocean and the dissection of an Aptian salt basin. *Geophysical Journal International* 177: 1315-1333.
- Towle, D.W.** (1981). Transport-related ATPases as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. *Journal of Experimental Zoology* 218: 89-95.
- Towle, D.W.** (1984 a). Regulatory function of (Na^+/K^+) ATPase in marine and estuarine animals. In: *Osmoregulation in estuarine and marine animals. Lecture notes on coastal and estuarine studies*. Péqueux A. Gilles R. and Bolis L. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany, 157- 170.
- Towle, D.W.** (1984 b). Membrane-bound ATPases in arthropod ion-transporting tissues. *American Zoologist* 24: 177-185.
- Towle, D.W.** (1990). Sodium transport systems in gills. In: *Comparative aspects of sodium cotransport systems*. Kinne R.K.H. (Ed.). Karger Publishing, Basel 241-263.
- Towle, D.W.** (1993). Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *Journal of Experimental Zoology* 265: 387-396.
- Towle, D.W. et D. Weihrauch** (2001). Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. *American Zoologist* 41: 770-780.
- Towle, D.W., R.S. Paulsen, D. Weihrauch, M. Kordylewski, C. Salvador, J.H. Lignot, C. Spanings-Pierrot** (2001). Na^+ , K^+ -ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. *Journal of Experimental Biology* 204:4005-4012.
- Towle, D.W., R.P. Henry et N.B.T. Erwilliger** (2011). Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 6: 115-125.
- Tresguerres, M., F. Katoh, H. Fenton, E. Jasinska et G.G. Goss** (2005). Regulation of branchial V-H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase and NHE2 in response to acid and base infusions in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Experimental Biology* 208: 345-354.
- Tresguerres, M., F. Katoh, E. Orr, S.K. Parks et G.G. Goss** (2006). Chloride uptake and base secretion in freshwater fish: a transepithelial ion-transport metabolon. *Physiological and Biochemical Zoology* 79: 981-996.
- Tsai, J.R. et H.C. Lin** (2007). V-type H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *The Journal of Experimental Biology* 210: 620-627.

- Urzúa, Á. et K. Anger** (2011). Larval biomass and chemical composition at hatching in two geographically isolated clades of the shrimp *Macrobrachium amazonicum*: intra- or interspecific variation? *Invertebrate Reproduction and Development* 55: 236-246.
- Vergamini, F.G., L.G. Pileggi et F.L. Mantelatto** (2011). Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology* 80: 67-83.
- Vilotte, O., G. Charmantier, P. Thuet et J.P. Trilles** (1980). Biologie de la cigale de mer, *Scyllarus arctus* (L., 1758) (Crustacea, Decapoda, Scyllariae): régulation osmotique et ionique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 290: 991-994.
- Weihrauch, D., J.C. McNamara, D.W. Towle H. Onken** (2004). Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *The Journal of Experimental Biology* 207: 4623-4631.
- Wesselingh, F. P. et C. Hoorn** (2011). Geological development of Amazon and Orinoco Basins. In: *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes*. Albert J.S. and Reis R.E. (Eds). The Regents of the University of California, 59-67.
- Wieczorek, H., G. Gruber, W.R. Harvey, M. Huss, H. Merzendorfer** (1999). The Plasma Membrane H⁺-V-ATPase from Tobacco Hornworm Midgut. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 31: 67-74.
- Willführ-Nast, J., H. Rosenthal, P.J. Udo et F. Nast** (1993). Laboratory cultivation and experimental studies of salinity effects on larval development in the African river prawn *Macrobrachium vollenhovenii* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Living Resources* 6: 115-137.
- Williamson, D.I.** (1972). Larval development in a marine and a freshwater species of *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 23: 282-298.
- Wilson, J.M., P. Laurent, B.L. Tufts, D.J. Benos, M. Donowitz, A.W. Vogl et D.J. Randall** (2000). NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion transport protein localization. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2279-2296.
- Ziegler, A.** (1997). Immunocytochemical localization of Na⁺/K⁺ ATPase in the calcium transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L. (Crustacea). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45: 437-446.

Résumé & Abstract

Les crevettes Palaemonidae sont issues d'un clade ancestral marin, qui a montré une tendance évolutive remarquable à s'adapter à des conditions non-marines, envahissant avec succès les milieux estuariens et limniques. Adulte, *Macrobrachium amazonicum* (A) est une espèce d'eau douce (ED) avec une stratégie d'exportation vers les estuaires des larves qui ont besoin d'eau salée pour se développer. Des populations se sont trouvées au cours du temps isolées en ED ; elles ont récemment été décrites comme une nouvelle espèce, *M. pantanalense* (P), qui a acquis au cours de son évolution la capacité d'effectuer tout son cycle en ED, grâce à l'acquisition de l'hyper-osmorégulation en ED dès l'éclosion, et en perdant l'hypo-osmorégulation en eau salée. Ces deux espèces représentent un bon modèle pour la reconstruction des transitions évolutives des crevettes de l'eau salée à l'ED. L'objectif de ce travail est de comprendre les différences liées à l'adaptation physiologique et moléculaire à l'ED et donc à l'osmorégulation entre les deux espèces au cours de l'ontogénèse. Pour cela nous avons étudié l'ontogénèse comparative des organes osmorégulateurs, en particulier de la cavité branchiale, et la localisation et expression de différents transporteurs ioniques. Au niveau structural, aux stades larvaires, P a un développement branchial plus précoce que A. La Na^+/K^+ ATPase (NKA) a été essentiellement immunolocalisée au niveau des branchies chez P et au niveau des branchiostégites chez A aux mêmes stades larvaires. Ceci suggère que la forte capacité d'hypo-osmorégulation durant l'ontogénèse de A est liée aux transports ioniques dans les branchiostégites, alors que les lamelles branchiales ne sont pas complètement développées. Sur le plan ultrastructural, les lamelles branchiales des deux espèces comportent deux types de cellules associées, les cellules septales et les cellules piliers qui toutes deux présentent des caractéristiques d'ionocytes. Une différenciation ultrastructurale a été observée au niveau des cellules piliers et de l'épithélium interne des branchiostégites suite à une acclimatation en ED. Ces cellules présentent des microvillosités apicales, profondes et nombreuses, ce qui semble être une adaptation aux faibles salinités permettant une absorption efficace d'ions. Les transporteurs ioniques impliqués dans l'osmorégulation ont été étudiés. La V-H^+ ATPase (VHA) a été détectée au niveau des cellules piliers et de l'épithélium interne des branchiostégites. La NKA et l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3) ont été localisés au niveau des cellules septales. Des différences d'expressions géniques de la VHA, du NHE3 et de la NKA ont été mesurées en comparant les 2 espèces à certains stades de développement. La distribution différentielle de ces transporteurs entre les cellules piliers et septales suggère que ces deux cellules pourraient fonctionner comme un complexe cellulaire pour absorber ou sécréter des ions. Chez P, la capacité de tous les stades à hyper-réguler en ED peut provenir du développement précoce des branchies fonctionnelles, et la perte de l'hypo-régulation peut être liée au manque de transports ioniques au niveau des branchiostégites. Enfin, les glandes excrétrices antennaires produisent de l'urine hypotonique chez les juvéniles et adultes des deux espèces en ED, ce qui diminue les pertes ioniques. Ces résultats illustrent des adaptations évolutives (perte et gain de fonctions) qui ont permis l'invasion des habitats d'ED.

Mechanisms of osmoregulation and evolutionary adaptation of palaemonid shrimp to estuarine and fresh waters

Palaemonid shrimps originate from an ancestral marine clade showing a remarkable evolutionary ability to adapt to non-marine conditions, successfully invading estuarine and limnic habitats. *Macrobrachium amazonicum* (A) is a freshwater (FW) species as an adult with an export strategy toward estuaries of larvae requiring salt water for their development. Over time, some populations ended up isolated in FW; recently, they have been described as a new species, *M. pantanalense* (P), which during its evolution has become able to complete its entire life cycle in FW, thanks to the acquisition of hyper-osmoregulation in FW from hatching, while losing hypo-osmoregulation in salt water. The two species offer a valuable model to reconstruct the evolutionary transitions of shrimps from salt water to FW. The objective of this study was to decipher the differences in physiological and molecular adaptations to FW, thus in osmoregulation, between both species during ontogeny. We studied the comparative ontogeny of osmoregulatory organs, particularly the branchial chamber, and the localization and expression of ion transporters. During the larval phase, we found that the gill development starts earlier in P than in A. Na^+/K^+ ATPase (NKA) was mainly localized in gills of P and in branchiostegites of A at the same larval stages. This suggests that the high capacity to hypo-osmoregulate during the ontogeny of A originates from ionic transports in branchiostegites, while gill lamellae are not fully developed. In both species, the gill lamellae contain two associated cells types, septal and pillar cells, displaying features of ionocytes. After FW acclimation, ultrastructural differences were observed in pillar cells and in the inner epithelium of branchiostegites. These cells possess numerous deep apical microvilli, a possible adaptation to low salinities for efficient ion uptake. Regarding ion transporters involved in osmoregulation, V-H^+ ATPase (VHA) was detected in pillar cells and in the inner branchiostegite epithelium. NKA and Na^+/H^+ exchanger (NHE3) were localized in septal cells. Differences in VHA, NHE3 and NKA gene expression were observed by comparing the two species at certain developmental stages. The differential distribution of these transporters between pillar and septal cells suggest that these two cells may function as a cell complex for ion absorption or secretion. In P, the capacity of all stages to hyper-regulate in FW may originate from the early development of functional gills; and the loss of hypo-regulation may originate from an absence of ion transport in branchiostegites. Finally, the excretory antennal glands produce hypotonic urine in juveniles and adults of both species in FW, thus reducing ion loss. These results illustrate evolutionary adaptations (gain and loss of functions) that have permitted the invasion of FW habitats.

Mots-clefs : crevette, *Macrobrachium*, salinité, osmorégulation, évolution, ontogénèse, branchies, VHA, NKA, NHE3